



**ANA CATARINA  
SOARES GAVINA**

**ENSAIOS COM PLANTAS NA AVALIAÇÃO DE  
RISCO DA MINA DE ERVEDOSA**

**PLANT ASSAYS IN THE RISK ASSESSMENT OF  
THE ERVEDOSA MINE (PORTUGAL)**



**ANA CATARINA  
SOARES GAVINA**

**ENSAIOS COM PLANTAS NA AVALIAÇÃO DE RISCO  
DA MINA DE ERVEDOSA**

**PLANT ASSAYS IN THE RISK ASSESSMENT OF THE  
ERVEDOSA MINE (PORTUGAL)**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada – Toxicologia e Ecotoxicologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Sara Cristina Ferreira Marques Antunes, Estagiária de pós-doutoramento, Departamento de Biologia e do CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar) da Universidade de Aveiro e da Doutora Ruth Maria de Oliveira Pereira, Investigadora auxiliar do Departamento de Biologia e do CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar) da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais e aos que sempre acreditaram em mim.

“Para ser grande, sê inteiro: nada

Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive”

Ricardo Reis, 1933

## **o júri**

Presidente

**Doutor António José Arsénia Nogueira**

Professor Associado com Agregação, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Doutora Glória Catarina Cintra da Costa Pinto**

Investigadora Auxiliar do CESAM e do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Doutora Ruth Maria de Oliveira Pereira**

Investigadora Auxiliar do CESAM e do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Doutora Sara Cristina Ferreira Marques Antunes**

Estagiária de Pós-Doutoramento do CESAM e do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Fernando Gonçalves por me ter acolhido no LEADER, proporcionando-me todas as condições para realizar este trabalho.

À Doutora Sara Antunes agradeço todo o apoio, paciência, dedicação, disponibilidade, preocupação e compreensão ao longo deste percurso.

Obrigada pelas correcções, críticas e sugestões. Muito obrigada!

À Doutora Ruth Pereira agradeço a partilha de conhecimento, o apoio, o incentivo e a disponibilidade com que me acompanhou durante este trabalho.

Obrigada pelas correcções, críticas e sugestões.

Agradeço também à Professora Doutora Maria da Conceição Santos, o suporte técnico do seu laboratório e à sua equipa. Um agradecimento especial à Doutora Glória e à Doutora Celeste, que deram uma grande ajuda na medição dos parâmetros fisiológicos e de *stress* oxidativo.

A todos os LEADER's, que me acolheram muito bem, muito obrigada por tudo e por todos os momentos! Agradeço também à Ana Luísa pela ajuda em alguns ensaios; muito obrigada ao João pela ajuda, cooperação, incentivo e por ter feito os mapas do local e à Tamira obrigada pela ajuda no trabalho prático.

Muito obrigada à Cláudia, à Teresa, ao Sérgio e à Sofia pelas conversas, pelos conselhos, pelas risadas... vocês são especiais!

Às amigas lá de casa: Andreia e Marlene obrigada por me terem aturado! Eu sei que, por vezes, não foi fácil... Obrigada pelo apoio e incentivo constantes!

Às grandes amigas: Bruna Marques, Fátima, Joana Lima, Patrícia Pinto, Patrícia Veríssimo, Ritinha, Rita (sardinha) e Sara Rodrigues obrigada por TUDO: por todos os momentos juntas, pelas longas conversas, pelas risadas, apoio, paciência, incentivo, companheirismo... enfim vocês são espectaculares!

Aos meus pais pelo esforço que fizeram, por terem acreditado em mim e pelo apoio e incentivo constantes!

Aos meus avós, padrinhos, tios e primos/as, muito obrigada por tudo!

Aos que não referi, mas que, por um motivo ou outro, também estiverem presentes. Obrigada!

## palavras-chave

*Zea mays*, *Lemna minor*, ensaios de crescimento, Mina de Ervedosa, parâmetros de fluorescência e bioquímicos

## resumo

A exploração mineira é uma das actividades antropogénicas que mais perturba o ambiente, quer em termos físicos e químicos, como paisagísticos. A característica dominante nos locais onde esta actividade decorre é a acumulação de escórias e desperdícios da exploração e do tratamento de minério. Estes desperdícios são, geralmente, ricos em elementos metálicos, alguns com toxicidade elevada, e minerais que em contacto com o ar (e.g. sulfuretos), dão origem a águas e escorrências ácidas, que comprometem igualmente a sustentabilidade das comunidades terrestres e aquáticas das zonas adjacentes. Deste modo, surge uma grande preocupação com as áreas mineiras, sendo reconhecido que as mesmas necessitam de ser recuperadas e/ou remediadas, de forma a mitigar os riscos que representam para os ecossistemas. Neste contexto, a análise de risco ecológico (ARE) é uma ferramenta importante na gestão destes locais, permitindo avaliar a probabilidade de existirem ou virem a ocorrer efeitos ambientais adversos. Assim e tendo por base Novais (2006), que indicava uma séria contaminação por metais nas zonas adjacentes à mina de Ervedosa (Vinhais, Bragança, Nordeste de Portugal), onde entre 1857 e 1969 se fez exploração, a céu aberto e subterrânea, de arsénio (As) e estanho (Sn), deu-se início a uma avaliação ecotoxicológica dos solos, para a obtenção de dados, a integrar futuramente numa ARE para o local. Após uma avaliação preliminar com base na linha de evidência química ter apontado para a possível existência de riscos, avançou-se para a segunda etapa, recolhendo informação ecotoxicológica, utilizando espécies de plantas para avaliar a capacidade de *habitat*, de produção e de retenção dos solos. Para o efeito, foram realizados ensaios de inibição do crescimento com *Lemna minor* (lentilha-de-água), para avaliar a toxicidade de elutriados dos solos e ensaios de germinação, crescimento e performance com *Zea mays* (milho). A presente dissertação teve ainda como objectivo avaliar a possível integração de outros parâmetros fisiológicos e de *stress* oxidativo nos ensaios de crescimento com plantas superiores terrestres, nomeadamente conteúdo hídrico, conteúdo em pigmentos (clorofilas e carotenóides) e parâmetros de fluorescência (Fv/Fm e Rendimento ΦPSII), permeabilidade da membrana, conteúdo em prolina e conteúdo em MDA, medindo a sensibilidade destes parâmetros à contaminação do solo e fornecerem informação sobre o estado fisiológico das plantas.

Os resultados do ensaio de inibição do crescimento com *Lemna minor* indicaram o comprometimento da função de retenção do solo, nos segmentos próximos do Rio Tuela, o levanta preocupações sobre a possível transferência de contaminação para este curso de água. No seu conjunto os diversos parâmetros fisiológicos e de fluorescência avaliados, mostraram uma maior sensibilidade e permitiram avaliar o comprometimento da performance de plantas sujeitas a outros solos. Esta informação a ser integrada numa análise de risco pelo peso das evidências iria reduzir o grau de incerteza relativamente à avaliação de riscos dos diferentes solos. Contudo, antes da integração destes novos parâmetros em ensaios de crescimento com plantas terrestres, é necessário perceber a influência das propriedades do solo na sua variabilidade.

## keywords

*Zea mays*, *Lemna minor*, growth assays, Ervedosa mine, fluorescence and biochemical parameters

## abstract

Mining is one of the anthropogenic activities with deeper deleterious effects (physical, chemical and landscape) in the environment. The dominant feature of mining areas is the accumulation of several tons of solid wastes resulting from ore exploration and treatments. These wastes are often rich in various metallic elements, some of high toxicity, and minerals which in contact with atmospheric conditions (e.g. sulphides), give rise to acidic waters and runoffs, which also threat terrestrial and aquatic communities in surrounding zones. Thus, there is great concern about the mining areas, and recognition that they need to be restored and remediated to mitigate the risks posed to ecosystems. In this context the ecological risk assessment (ERA) becomes a valuable tool for the management of these sites. Based on previous studies, which indicated a serious metal contamination in areas adjacent to Ervedosa mine (Vinhais, Bragança, NE Portugal), where between 1857 to 1969 open-pit and underground exploration of arsenic (As) and tin (Sn), the collection of ecotoxicological data with potential to be integrated on ERA has started. After a preliminary assessment based on the chemical line of evidence which has pointed for the possible existence of risks, it was decided to collect ecotoxicological information using mainly plant species to assess *habitat*, production and retention function of soils. For this purpose, tests with the whole soil matrix and soil elutriates were performed, namely: germination and growth assays with *Zea mays* (maize) and growth inhibition assays with *Lemna minor*, (common duckweed), respectively. This work was also aimed at assessing the possible integration of other physiological and oxidative stress parameters in the growth tests with terrestrial higher plants, namely water content, pigments (chlorophylls and carotenoids), fluorescence (Fv / Fm and Yield  $\Phi$ PSII), membrane permeability, proline and MDA content by measuring the sensitivity of these parameters to soil contamination, as well as the possibility of giving additional information on the physiological status of plants.



In a general way, with the exception of a soil collected near a the old mill where the ore was treated, for which a total inhibition of *Zea mays* seed germination has occurred, the growth parameter only allowed to detect the toxicity of another soil, collected near the exploration area. Further the results from the growth inhibition assay with *Lemna minor* pointed out for the impact in the retention function of some soils, collected near the Tuela River, giving rise to concerns about the possible mobility of contaminants to this aquatic system. Together the other biochemical and fluorescence parameters, aimed in evaluating the performance of plants, have shown to be more sensitive showing that plants exposed to other soils also have their performance compromised. This information integrated in the ERA process, based in a weight of evidence approach, will reduce the uncertainty of the evaluation. However, before suggesting the integration of these parameters in standard protocols for growth assays with terrestrial plants is necessary to perceive the influence of soil parameters in their variability.

## Índice

	Página
<b>Introdução</b>	<b>3</b>
1.1. Ensaios de fitotoxicidade	9
1.2. Objectivos e estrutura da dissertação	11
<b>Material e Métodos</b>	<b>15</b>
2.1. Local de estudo	15
2.2. Amostragem	16
2.3. Determinação de parâmetros físico – químicos	17
2.4. Determinação do conteúdo em metais	18
2.5. Ensaio de ecotoxicidade com <i>Lemna minor</i>	19
Manutenção da cultura <i>L. minor</i>	19
Ensaio de inibição de crescimento de <i>Lemna minor</i>	20
2.6. Ensaio de ecotoxicidade com <i>Zea mays</i>	21
Emergências e biomassa aérea	23
Conteúdo hídrico	23
Pigmentos (clorofilas e carotenóides)	24
Fluorescência (Fv/Fm e $\Phi$ PSII)	25
Permeabilidade da membrana	25
Prolina	26
Conteúdo em Malondialdeído (MDA)	26
Análise estatística	27
<b>Resultados</b>	<b>31</b>
3.1. Parâmetros físico-químicos	31
3.2. Concentrações totais e extraíveis de metais no solo	32
3.3. <i>Lemna minor</i>	34
3.4. Germinação, crescimento e performance de <i>Zea mays</i>	35
<b>Discussão</b>	<b>43</b>
<b>Conclusão</b>	<b>53</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>57</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> – Esquema das etapas da Análise de Risco Ecológico (adaptado de Weeks e Comber, 2005).	7
<b>Figura 2</b> – Esquema simplificado dos principais ensaios para avaliar a toxicidade de solos contaminados.	9
<b>Figura 3</b> – Localização geográfica da área de estudo.	15
<b>Figura 4</b> – Esquema representativo da área de estudo e dos pontos de amostragem.	17
<b>Figura 5</b> – Fotografia em corte do sistema utilizado para o ensaio com <i>Z. mays</i> .	23
<b>Figura 6</b> – Esquema do sistema utilizado para o ensaio de <i>Z. mays</i> .	23
<b>Figura 7</b> – Percentagem de emergências do ensaio de <i>Zea mays</i> . As barras de erro correspondem ao desvio padrão.	37
<b>Figura 8</b> – Biomassa aérea e conteúdo hídrico nas plantas expostas aos diferentes solos recolhidos na área da mina de Ervedosa e ao solo artificial OCDE. As barras de erro correspondem ao desvio padrão e os * correspondem às diferenças significativas (Teste Dunnett $p \leq 0,001$ ).	37
<b>Figura 9</b> – Pigmentos: conteúdo em clorofila <i>a+b</i> e em carotenóides das plantas expostas aos diferentes solos recolhidos na área da mina de Ervedosa e ao solo artificial OCDE. As barras de erro correspondem ao desvio padrão e os * correspondem às diferenças significativas (Teste Dunnett $p \leq 0,001$ ).	38
<b>Figura 10</b> – Parâmetros de fluorescência: eficiência fotoquímica máxima ( $F_v/F_m$ ) e rendimento da planta ( $\Phi_{PSII}$ ) nas plantas expostas aos diferentes solos recolhidos na área da mina de Ervedosa e ao solo artificial OCDE. As barras de erro correspondem ao desvio padrão e os * correspondem às diferenças significativas (Teste Dunnett $p \leq 0,001$ ).	38
<b>Figura 11</b> – Indicadores de <i>stress</i> : permeabilidade da membrana, conteúdo em malondialdeído (MDA) e prolina, nas plantas expostas aos diferentes solos recolhidos na área da mina de Ervedosa e ao solo artificial OCDE. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.	39

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1</b> – Composição do meio de cultura Steinberg (OCDE, 2006).	20
<b>Tabela 2</b> – Valores dos parâmetros físico-químicos medidos: $pH_{KCl}$ , condutividade, MO – matéria orgânica e CRA – capacidade de retenção da água das amostras de solo. A negrito destaca-se os valores mais elevados registados para cada um dos parâmetros.	32
<b>Tabela 3</b> – Concentração média de metais nos solos de acordo com diferentes métodos de extracção: extracção com cloreto de cálcio (0,01M) e extracção com <i>aqua regia</i> . A negrito encontram-se os valores mais altos registados para cada metal e a sublinhado o valor mais baixo. ILD – inferior ao limite de detecção.	33
<b>Tabela 4</b> – Valores de $IC_{50}$ e respectivos intervalos de confiança a 95%, determinados para <i>Lemna minor</i> . NT - Sem toxicidade.	34
<b>Tabela 5</b> – Tabela resumo das análises de variância (ANOVA) de uma via efectuadas para os diferentes parâmetros.	36
<b>Tabela 6:</b> Quadro-resumo das diferenças significativas observadas para cada parâmetro avaliado no ensaio com <i>Zea mays</i> entre os solos relativamente ao solo REF.	54

## Introdução

---



## 1. Introdução

Actividades humanas como a indústria, a agricultura, a exploração mineira, assim como o aumento exponencial da população mundial com os seus padrões de consumo crescente têm contribuído para uma série de perturbações nos ecossistemas e para a perda da sua sustentabilidade e biodiversidade. A degradação dos ecossistemas tem consequências nefastas, directas e indirectas, para os seres humanos, nomeadamente perda de matérias-primas e alimentos, incremento das dificuldades em manter água potável, na eliminação de resíduos e dificuldades na regulação do clima, devido ao desaparecimento de coberto vegetal estável (Díaz et al., 2006; Naidu, et al., 2010).

O solo é o componente físico dos ecossistemas terrestres sendo considerado um sistema bastante dinâmico, complexo e com grande heterogeneidade espacial. Este funciona ainda como uma reserva de biodiversidade e plataforma para a maioria das actividades humanas, fornecendo matérias-primas, servindo de reservatório de carbono e conservando o património geológico e arqueológico. Em suma, o solo é vital para a sustentabilidade dos ecossistemas e para a sobrevivência da espécie humana (O'Halloran, 2006). Do ponto de vista da sua génese, o solo pode ser considerado um recurso não renovável, pois as suas taxas de degradação são rápidas, enquanto que os seus processos de formação e regeneração são extremamente lentos (Wild, 1993; Swartjes et al., 2008). O solo é um sistema heterogéneo, constituído por minerais, matéria orgânica, água e ar, estando sujeito a variações das suas propriedades (e.g. humidade e pH) em função das condições climáticas (Wild, 1993). A qualidade do solo depende da sua capacidade de sustentar a produtividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde das plantas e dos animais (Wienhold, 2004). Por outro lado, tem uma grande capacidade de reter e concentrar contaminantes, sendo também muito vulnerável à sua acumulação. Por vezes, as concentrações de contaminantes são mais elevadas no solo do que em qualquer outro compartimento e como este tem uma renovação mais lenta, tal facto pode ter consequências devastadoras não só para as comunidades edáficas, mas também para as comunidades humanas que dele dependem (Wild,

1993; EEA, 2000; CCE, 2006; O'Halloran, 2006).

O solo está sujeito a uma série de processos de degradação ou ameaças, nomeadamente: erosão com consequente diminuição do conteúdo em matéria orgânica, contaminação antropogénica, impermeabilização, compactação, diminuição da biodiversidade, salinização, cheias e deslizamentos de terra, entre outros. A degradação do solo é provocada e/ou agravada pelas actividades antropogénicas, impedindo o solo de exercer as suas funções e serviços (Swartjes et al., 2008). A exploração mineira é uma actividade industrial que exerce enormes pressões sobre o ambiente, quer em termos químicos e físicos, quer paisagísticos (Pereira et al., 2004). Amontoados de escórias e desperdícios da exploração mineira são a característica dominante nestes locais, uma vez que normalmente é necessário extrair grandes quantidades de minério para conseguir quantidades economicamente rentáveis do metal que se pretende. Além disso, e em estudos já efectuados, demonstrou-se que estes desperdícios da exploração apresentam um conteúdo em metais significativo (Pereira et al., 2004; Pereira et al., 2004; Rainbow et al., 2011; Vásquez-Murrieta et al., 2006; Razo et al., 2004). Por outro lado, os processos de tratamento do minério são grandemente responsáveis pela degradação das áreas adjacentes, uma vez que utilizam processos altamente agressivos (e.g. lavagens ácidas) e por envolverem elevada quantidade de água. Os resíduos remanescentes nestas áreas, quer de natureza sólida ou líquida, são geralmente ricos em elementos metálicos tóxicos e/ou radioactivos e com elevada acidez, comprometendo a sustentabilidade das comunidades terrestres e aquáticas das zonas circundantes (e.g. Lopes et al., 1999; Ribeiro et al., 2000; Antunes et al., 2008a). Como resultado do potencial risco para os ecossistemas das zonas adjacentes, decorrente da exposição a contaminantes, a avaliação dos riscos e a remediação dos solos contaminados para mitigação dos mesmos tornou-se uma prioridade. O objectivo principal de qualquer processo de remediação é reduzir a ameaça real ou potencial para o ambiente e reduzir riscos para os humanos e outros seres vivos (Naidu et al., 2010).

Neste contexto, a análise de risco ecológico (ARE) surge como uma ferramenta fundamental para gerar informação e assim determinar a estratégia

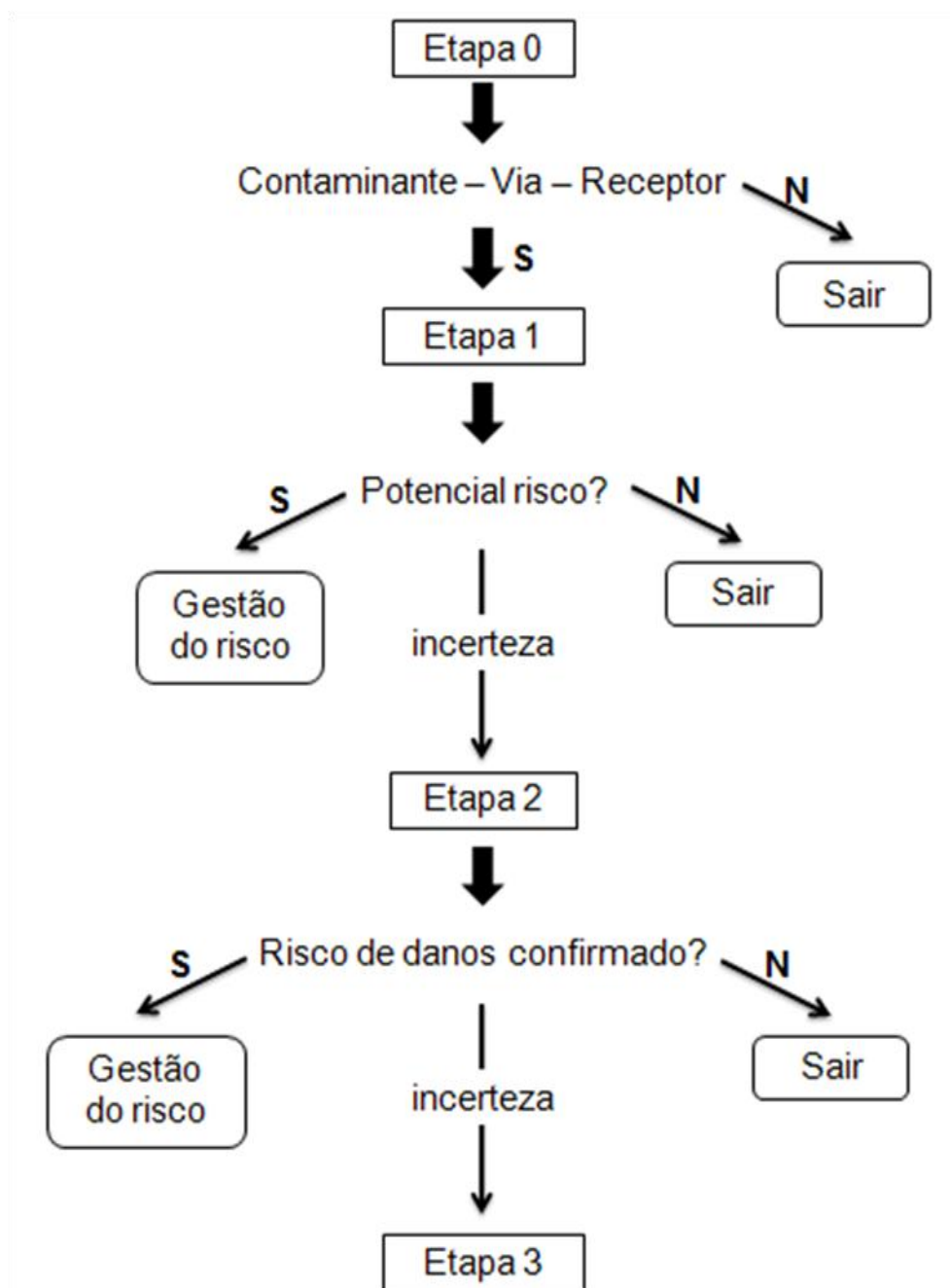
mais adequada de gestão e intervenção nestes locais. Este processo avalia os riscos associados a actividades passadas – avaliação retrospectiva - (e.g. avaliação de locais contaminados como zonas de exploração mineira), ou a actividades que se perspectivam com impacto no ambiente – avaliação preditiva - (USEPA, 1998; Suter et al., 2000; Kim et al., 2005; Weeks e Comber, 2005; Lee et al., 2006; Pereira et al. 2009; Moreno-Jiménez, 2011). A ARE aplicada a locais contaminados, avalia os efeitos ecológicos provocados pelas actividades humanas sobre os indivíduos, populações, comunidades ou ecossistemas (Weeks e Comber, 2005).

Os modelos Europeus para a ARE de locais contaminados propõem uma abordagem estruturada em etapas, que integra informação de três linhas de evidência: química, toxicológica e ecológica (Rutgers et al., 2000; Weeks e Comber, 2005; Jensen e Mesman, 2006), sendo por isso designada por TRÍADE. A complexidade da avaliação aumenta ao longo das etapas (Figura 1), recorrendo inicialmente a métodos laboratoriais, simples e de curta duração, e, posteriormente, a métodos mais complexos, de longa duração, muitas vezes conduzidos no local, com avaliação de parâmetros funcionais mais integradores. Para cada linha de evidência existem ensaios que permitem obter informação de forma progressiva e mais detalhada sobre o local, reduzindo o grau de incerteza associado à avaliação em curso.

A linha de evidência química baseia-se na caracterização físico-química do local (solo, recursos aquáticos, sedimentos) e sugere a comparação da concentração total dos contaminantes presentes nas matrizes ambientais com valores de referência, ou ainda, valores de rastreio, definidos para esses contaminantes, nas respectivas matrizes. Esta comparação permite uma avaliação preliminar dos riscos. Estes valores de rastreio são concentrações limite para contaminantes em solos, águas e/ou sedimentos, acima das quais se recomendam ou são exigidos determinados tipos de acção de mitigação dos riscos (Provoost et al., 2008). A determinação destes valores de rastreio envolve a obtenção de dados de toxicidade, obtidos previamente em ensaios (Fishwick, 2004; Carlon, 2007). Ainda, no âmbito da linha de evidência química são importantes estudos de avaliação da biodisponibilidade dos contaminantes, assim



como a avaliação da sua bioacumulação (Peijnenburg e Jager, 2003; Jensen e Mesman, 2006; Gupta e Sinha, 2007; Peijnenburg et al., 2007; Semenzin et al., 2007; Lee et al., 2011). Medidas de quantificação da biodisponibilidade dos contaminantes podem ser feitas em laboratório através de diversos processos de extracção (Sauvé et al., 2000; Lee et al., 2011). No entanto, *in situ* esta avaliação poderá ser quantificada através de factores de bioconcentração (FBC), que correspondem à razão entre a concentração dos contaminantes nos organismos e na matriz ambiental em causa (Caussy et al., 2003), na medida que a biodisponibilidade não é determinada apenas por processos físico-químicos que ocorrem no solo, mas também pela variabilidade de vias de exposição (ingestão, inalação ou por via cutânea) das diferentes espécies (Naidu et al., 2010).

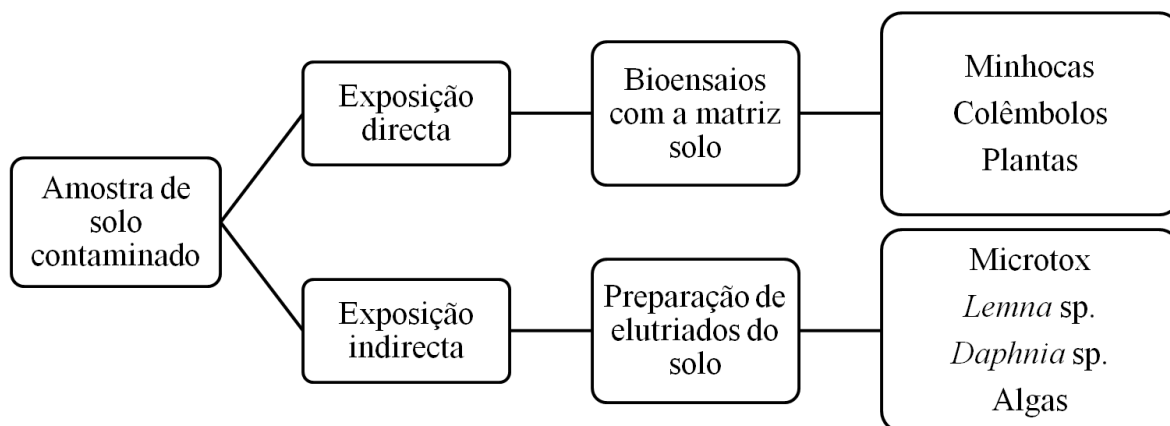


**Figura 1** – Esquema das etapas da Análise de Risco Ecológico (adaptado de Weeks e Comber, 2005).

Para a linha de evidência toxicológica realizam-se ensaios em laboratório ou *in situ*, com espécies de diferentes níveis taxonómicos, sempre que possível padronizados quer pela ISO (International Standardization Organization) quer pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) (Figura 2) e que avaliem diferentes parâmetros a nível do indivíduo (e.g. evitamento, mortalidade, crescimento) ou a níveis inferiores ou superiores de organização

biológica (Jensen e Mesman, 2006; Antunes et al., 2008a; Semenzin et al., 2008; Sousa et al., 2008; Pereira et al., 2009). Estes ensaios permitem também uma avaliação do impacto da contaminação nas diferentes funções do solo, nomeadamente na qualidade de *habitat*, de produção e de retenção. Os ensaios ecotoxicológicos têm ainda a vantagem de nos fornecerem informação acerca da biodisponibilidade dos contaminantes e da sua toxicidade (Jensen e Mesman, 2006). Tal como já mencionado anteriormente, a complexidade dos ensaios aumenta à medida que se progride nas etapas do processo de análise de risco (Figura 1). Assim, e para o compartimento terrestre, na primeira etapa são realizados ensaios de curta duração: ensaios de inibição da bioluminescência com a bactéria *Vibrio fischeri* (ensaios de Microtox<sup>®</sup>) (Azur, 1998), ensaios de evitamento com minhocas (ISO, 2007) e colêmbolos (ISO, 2008), ensaios de imobilização com cladóceros (ISO, 1996b; ASTM, 1997; OCDE, 2000), ensaios de germinação de sementes (ISO, 1995), ensaios de inibição do crescimento algal (OCDE, 1984) e ensaios de inibição do crescimento de *Lemna minor* (OCDE, 2006). A informação obtida com estes ensaios, designados por ensaios de rastreio da toxicidade, é integrada com a informação fornecida pela linha de evidência química, para reforçar a avaliação por ela feita. Ensaios padronizados de longa duração [e.g. ensaios de reprodução com minhocas (ISO, 1996a), colêmbolos (ISO, 1999), enquitraídeos (ISO, 2004a) e ácaros (OCDE, 2007), ensaios crónicos com *D. magna* (ISO, 2000), ensaios de crescimento de plantas (ISO, 1995) e ainda ensaios de determinação da biomassa microbiana (ISO, 1997), de medição da respiração do solo (ISO, 2002), etc.] são normalmente os utilizados na etapa 2 podendo alguns destes serem adaptados para aplicação em campo na etapa 3 da avaliação de risco (Antunes et al., 2008b; Moreira-Santos et al., 2011; Lourenço et al., 2011). Quanto à linha de evidência ecológica, geralmente integra parâmetros de avaliação da diversidade estrutural e funcional das comunidades (e.g. abundância e diversidade das espécies), medição da actividade da fauna edáfica (e.g. ensaio de *Bait-lamina*) (André et al., 2009), avaliação da capacidade de decomposição da matéria orgânica (ensaio de *litter bags*), entre outros. Estes ensaios caracterizam o estado das comunidades biológicas, permitindo definir o estado biológico do local (Weeks e Comber, 2005;

Jensen e Mesman, 2006). A informação fornecida pelas três linhas de evidência é única e complementar, sendo necessário a combinação da informação das três linhas de evidência para o cálculo dos riscos, pois uma componente por si só não fornece informação suficiente e abrangente para o local (Chapman, 1990; Semenzin et al., 2008).



**Figura 2** – Esquema simplificado dos principais ensaios para avaliar a toxicidade de solos contaminados.

### 1.1. Ensaios de fitotoxicidade

As plantas são componentes essenciais dos ecossistemas, pois são os produtores primários de matéria orgânica e de oxigénio e fonte de alimento para os organismos heterotróficos (Verkleij, 1994). São consideradas ferramentas versáteis para identificar e monitorizar os efeitos de poluentes no solo (Gong et al., 2001; Loureiro et al., 2006; Pereira et al., 2009; Lima et al., 2011). Estas podem ser usadas como bioindicadores de avaliação de toxicidade nos ecossistemas aquáticos e terrestres (Azevedo et al., 2005; Gorsuch et al., 1991; Lima et al., 2011; An, 2004). As plantas têm sido amplamente utilizadas em bioensaios por diversas razões: i) têm uma existência sedentária, pelo que podem ser continuamente expostas a uma fonte de poluição ao longo do seu ciclo de vida; ii) as plantas são relativamente baratas e de fácil manutenção em ambientes artificiais; iii) obtém-se informação rapidamente, pois as suas respostas biológicas podem ser avaliadas num curto intervalo de tempo; iv) a sua condição/performance pode ser monitorizada de diferentes formas, desde

observações físicas a métodos espectroscópicos (Pfleeger et al., 1993; Krugh e Miles, 1996; Verkleij, 1994). De forma a garantir a comparação de resultados entre estudos e laboratórios, existe uma lista de espécies de plantas padronizadas que podem ser utilizadas em ensaios de toxicidade (ISO, 1995; OCDE, 2003). Este grupo de espécies de plantas foi identificado de acordo com um conjunto de critérios: i) elevada percentagem de emergências; ii) curto tempo para a emergência; iii) elevada taxa de crescimento inicial; iv) variabilidade limitada para os parâmetros medidos nos indivíduos e nas réplicas; v) relação concentração-resposta discernível; vi) tamanho da semente (facilitando o manuseamento); vii) resistência da raiz, o que permite a separação das raízes do solo; e viii) stock de sementes de qualidade disponíveis (van Assche et al., 2002).

As plantas existentes em locais contaminados por metais estão expostas a um substrato desfavorável ao seu crescimento, pois estão sujeitas a alterações de diversos factores: pH ácido, altas concentrações de metais e baixo teor de nutrientes (Ha et al., 2011). Os locais contaminados por metais apresentam, na maioria das situações, uma mistura complexa de contaminantes (van Assche et al., 2002). No entanto, os metais estão presentes no solo numa variedade de formas, disponíveis ou não para os organismos (nomeadamente para as plantas). A disponibilidade dos elementos metálicos é determinada pelas características do solo (e.g. argila, pH, conteúdo de matéria orgânica e humidade) que, uma vez alteradas, podem incrementar a disponibilidade dos elementos para as plantas (CARACAS, 1998; Caussy et al., 2003).

Os efeitos dos metais nas plantas são bem conhecidos (Munzuroglu e Geckil, 2002). Estes exercem uma forte influência no crescimento, quer das suas partes aéreas, quer subterrâneas, assim como na redução da actividade fotossintética a qual acaba por estar correlacionada com uma senescência precoce (Maksymiec, 2007; Pereira et al., 2009; Clijsters e van Assche, 1985). Por exemplo, alguns estudos já demonstraram que exposição a metais causa efeitos de *stress* nas plantas, afectando a taxa fotossintética, a condutância estomática e a fluorescência da clorofila *a* (Monni et al., 2001; Fayiga et al., 2004; Monteiro et al., 2009; Franco-Hernández et al., 2010). Por outro lado, a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) em plantas expostas a metais pode provocar danos

não só nas membranas lipídicas mas também a nível de ADN (Monteiro et al., 2009). A condição das folhas (e. g. verificar se estão murchas, se apresentam clorose - endurecimento e amarelecimento das folhas, se estão escurecidas e senescentes) é, também, um importante indicador de *stress* (van Assche et al., 2002). A inibição do crescimento e o decréscimo da biomassa são igualmente parâmetros indicativos de efeitos tóxicos de xenobióticos observados nas plantas.

No que refere aos ensaios com plantas (ensaios de fitotoxicidade), os protocolos padronizados propõem avaliar parâmetros como a emergência, o crescimento da planta e a inibição do crescimento da raiz (CARACAS, 1998; ISO, 1995). Tal como outros ensaios, estes podem ser considerados agudos, quando se avaliam potenciais efeitos imediatos como a percentagem de germinação, crescimento e biomassa, ou crónicos quando avaliam efeitos a longo prazo que envolvem o ciclo de vida da planta (van Assche et al., 2002). Contudo, existem vários parâmetros, que podem ser avaliados nas plantas, que potencialmente poderão ser mais sensíveis e indicativos e que geralmente não são considerados nos ensaios pelo facto de não estarem incluídos nos protocolos padronizados. Assim, além dos parâmetros padronizados poderá ser igualmente importante avaliar outros parâmetros fisiológicos (e.g. fluorescência da clorofila *a*, actividade enzimática) e bioquímicos (e.g. conteúdo em malondialdeído e prolina) (Verkleij, 1994; Loureiro et al., 2006).

## **1.2. Objectivos e estrutura da dissertação**

O objectivo global da presente dissertação de mestrado foi gerar informação ecotoxicológica sobre plantas terrestres e aquáticas, a ser integrada nas etapas 1 e 2 de uma análise de risco ecológico em curso para a mina de Ervedosa (Vinhais, Bragança, Portugal). Para cumprir este objectivo foram propostos dois objectivos específicos:

- i) avaliar a toxicidade de elutriados e de solos recolhidos na área mineira de Ervedosa, através da realização de ensaios com *Lemna minor* e *Zea mays*;
- ii) avaliar a possível integração de parâmetros fisiológicos e de *stress* oxidativo em ensaios ecotoxicológicos com plantas, através da avaliação

de sensibilidade destes parâmetros à exposição a solos contaminados com metais.

A presente dissertação apresenta-se estruturada nas seguintes secções: 1) Introdução, onde é abordada a temática da avaliação de risco de locais contaminados, com especial ênfase na linha de evidência ecotoxicológica e ensaios de plantas, em particular; 2) Material e Métodos, onde é realizada uma descrição do local de estudo, do desenho de amostragem, da metodologia dos ensaios ecotoxicológicos, dos parâmetros medidos e dos métodos estatísticos utilizados na análise dos mesmos; 3) Resultados, onde é feita uma apresentação e descrição da informação obtida para os parâmetros avaliados nos ensaios, através de tabelas e gráficos, expressando não apenas medidas de tendência central e de variabilidade dos dados, como também os resultados dos testes de hipóteses; 4) Discussão, onde se faz a interpretação dos resultados obtidos em relação a estudos já publicados por outros autores e por último, 5) Conclusão, que tenta integrar toda a informação obtida na dissertação, quer como um contributo para avaliação da toxicidade de solos, quer avaliando o contributo que a mesma trouxe para o conhecimento científico na área da avaliação de risco de locais contaminados, através da validação e sensibilidade de novos parâmetros a serem integrados em ensaios de toxicidade padronizados.

## **Material e Métodos**

---

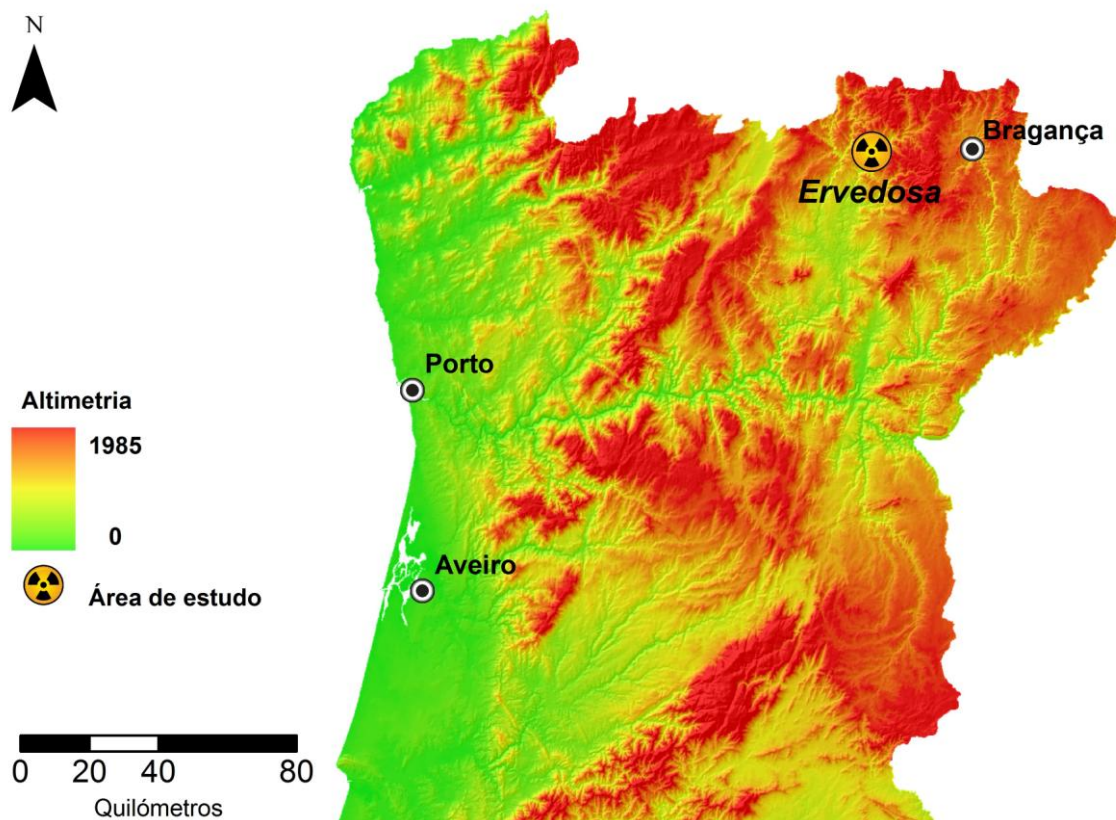




## 2. Material e Métodos

### 2.1. Local de estudo

A mina de Ervedosa está localizada na freguesia de Vinhais, distrito de Bragança, Nordeste de Portugal (Figura 3), onde durante anos (de 1857 a 1969) se realizou exploração a céu aberto e subterrânea de estanho (Sn) e arsénio (As). Esta região é atravessada pelo rio Tuela que, juntamente com o rio Rabaçal, forma o rio Tua - um dos principais afluentes do rio Douro (ver Carvalho et al., 2010). A contaminação ambiental por metais foi avaliada e reportada por Novais (2006). Os níveis de metais detectados no solo desta zona levantaram preocupações relativamente aos riscos para as comunidades locais, o que desencadeou a recolha de informação que poderá vir a ser integrada numa avaliação de risco ecológico (ARE) para as zonas circundantes.



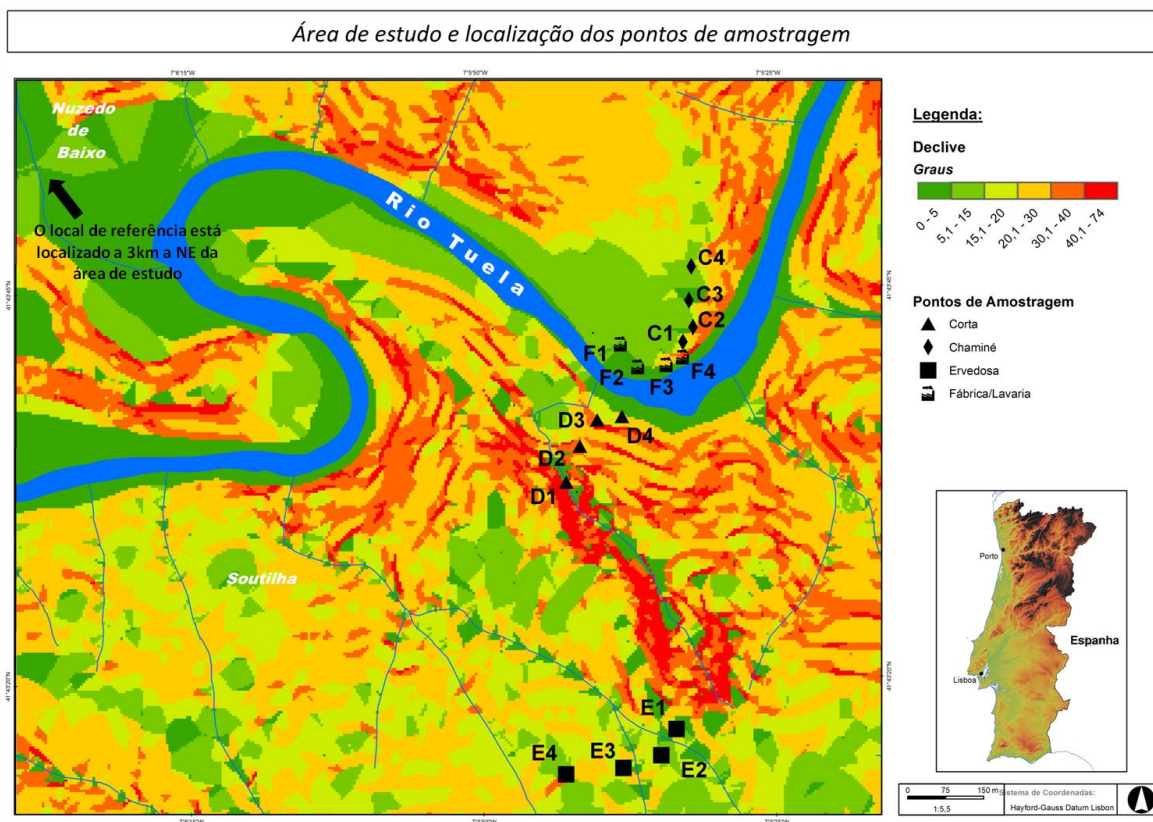
**Figura 3** – Localização geográfica da área de estudo.

## **2.2. Amostragem**

Na área mineira e zona circundante foram considerados quatro segmentos (C, D, E e F), com quatro pontos de amostragem, cada um, distanciados entre si de cerca de 50 m (Figura 4). Adicionalmente, foi seleccionado um potencial local de referência a uma distância de aproximadamente 3 km da mina. O segmento C teve início numa antiga chaminé da fábrica de processamento do minério [onde o material rochoso era triturado até atingir uma granulometria equivalente à areia e, posteriormente, colocado em mesas vibratórias, onde se recuperava a cassiterite e a arsenopirite (Novais, 2006)], e estendia-se em direcção a Norte, terminando numa zona recentemente intervencionada através da replantação de carvalhos (*Quercus* sp.). No segmento D, os pontos foram distribuídos a partir da zona de exploração em direcção ao rio Tuela. O primeiro ponto do segmento E estava localizado a sul das escavações e os restantes pontos deste segmento foram distribuídos em direcção à aldeia de Ervedosa. O segmento F foi definido paralelamente ao rio Tuela, ao longo de um velho edifício (a fábrica) onde o minério era transformado e preparado para o transporte. Os segmentos C e F foram escolhidos devido à sua proximidade a campos agrícolas e às habitações. Estes locais poderão ser potenciais fontes de contaminação, uma vez que o processamento do minério ocorria nessa área. O segmento D foi amostrado com o intuito de avaliar um possível gradiente de toxicidade desde o centro da exploração até ao compartimento aquático (rio Tuela). Este local mereceu especial atenção uma vez que ao longo do período de exploração foram depositadas toneladas de escória neste local. A avaliação dos solos do segmento E foi seleccionada com o intuito de avaliar a extensão da dispersão da contaminação, em direcção à aldeia de Ervedosa.

Nos 17 pontos de amostragem seleccionados foram recolhidas amostras superficiais de solo (0-20 cm). Estas foram transportadas para o laboratório, onde foram colocadas a secar à temperatura ambiente, homogeneizadas e crivadas (crivo de 5 mm), sendo a fracção menor que 5 mm armazenada para posterior determinação das propriedades físico-químicas do solo (pH, condutividade,

humidade, capacidade de retenção hídrica, teor de matéria orgânica e conteúdo em metais) e para a realização de ensaios ecotoxicológicos.



**Figura 4** – Esquema representativo da área de estudo e dos pontos de amostragem.

### 2.3. Determinação de parâmetros físico – químicos

O pH e a condutividade do solo foram determinados de acordo com os métodos descritos em FAOUN (1984). Assim para a determinação do pH do solo foram pesadas 10 g de solo, às quais foram adicionados 50 ml de água destilada. As suspensões foram agitadas mecanicamente durante 15 min., findo este período deixou-se a suspensão a repousar durante 30 min. para medição do pH com o auxílio de um medidor de pH (WTW330/SET-2). As mesmas suspensões foram deixadas a repousar cerca de 12 h para medição da condutividade, com um condutímetro (LF330/SET). O pH do solo foi também medido com base na metodologia descrita no protocolo ISO 10390 (ISO, 2005) numa solução de KCl (1 M).

A capacidade de retenção hídrica dos solos foi determinada segundo protocolo padronizado (ISO, 2005). Para o efeito, colocaram-se amostras de solo ( $\approx 25$  g) em frascos de plástico, em que o fundo foi removido e substituído por papel de filtro. De seguida, colocaram-se os frascos num tabuleiro com água de modo a ficarem imersos, durante 3 h. Após este período, colocaram-se os frascos em papel absorvente de forma a remover o excesso de água, durante aproximadamente 2 h. Posteriormente, os frascos foram pesados e colocados na estufa a 105°C até peso constante (ISO, 2005). A capacidade de retenção hídrica foi determinada através da seguinte fórmula:

$$\text{WHC} = [(P_{\text{solo encharcado}} - P_{\text{solo seco na estufa}}) / P_{\text{solo seco na estufa}}] \times 100$$

A humidade do solo, um parâmetro importante para ajuste do conteúdo em água do solo nos ensaios ecotoxicológicos, foi calculada a partir da perda de peso após secagem na estufa a 105°C, durante 24 h. O teor de matéria orgânica foi determinado pela perda por combustão a 450°C, durante 8 h, na mufla (SPAC, 2000). Todos os parâmetros descritos anteriormente foram medidos em triplicado.

#### **2.4. Determinação do conteúdo em metais**

O conteúdo em metais das amostras de solo foi determinado segundo dois métodos de extracção: *aqua regia* e extracção com cloreto de cálcio 0,01 M. Na extracção por *aqua regia*, colocou-se 1 g de cada amostra de solo em frascos de teflon, aos quais foram adicionados 3 ml de ácido clorídrico (HCl 37% *pro analysis*, Panreac®) e 1 ml ácido nítrico 65% (HNO<sub>3</sub> 65%, Suprapur, Merck®). Seguidamente, os frascos foram bem fechados e colocados num banho de areia, a 100°C, durante 5 h. Após este tempo, os frascos foram retirados do banho e deixados a arrefecer à temperatura ambiente. De seguida, foram adicionados 10 ml de HNO<sub>3</sub> (4 N). De forma a remover eventuais resíduos, a solução foi filtrada através de filtros 0,2  $\mu\text{m}$  FT30/0.2CA-S. O filtrado foi transferido para tubos volumétricos e aferidos a 25 ml com água destilada. A concentração de alguns metais previamente seleccionados (Al, Pb, P, V, Mn, Fe, Cu, Zn, As, Sb, Ba, Sn) foi analisada por espectrometria de massa acoplada a plasma induzido (ICP-MS, utilizando um equipamento Thermo X-Series quadrupole ICP-MS (Thermo Scientific), equipado com cones de níquel e um nebulizador Burgener refrigerado

com um sistema de Peltier. Como controlo de qualidade do processo extracção foram efectuados brancos que passaram pelo mesmo processo e utilizando os mesmos reagentes.

Para o método de extracção com cloreto de cálcio a 0,01 M, foi preparada uma suspensão de solo numa proporção de 1:10 (m/v) numa solução de  $\text{CaCl}_2$  (0,01 M) (Houba, et al., 2000). As suspensões de solo foram agitadas mecanicamente durante 2 h, a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Seguidamente, as suspensões foram centrifugadas a 4000 rpm e acondicionadas (acidificada a  $\text{pH} < 2$  com  $\text{HNO}_3$ ) para posterior quantificação de metais. Foram realizados brancos através do mesmo processo e utilizando os mesmos reagentes. A análise química dos metais foi efectuada de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

## **2.5. Ensaio de ecotoxicidade com *Lemna minor***

### **Manutenção da cultura de *L. minor***

A macrófita *Lemna minor* foi mantida em laboratório sob condições de cultura controladas (temperatura  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ; fotoperíodo 16 h<sup>L</sup>:8 h<sup>E</sup>; intensidade luminosa de aproximadamente 10 000 lux). A cultura de *L. minor* foi realizada em erlenmeyers com meio de cultura Steinberg, cuja composição se encontra descrita na tabela 1 (OCDE, 2006), e tapados com algodão envolto em gaze, de modo a evitar contaminação. Na preparação do meio de cultura Steinberg, as 7 primeiras soluções, indicadas na tabela 1, são adicionadas, pela ordem descrita, à água destilada e a mistura é autoclavada. O tempo de esterilização é de 20 min. por cada litro de meio Steinberg a 1 atm. Após a esterilização, o meio é deixado a arrefecer e, por fim, é adicionada a solução 8, para evitar a degradação da mesma, pela temperatura. Semanalmente, a cultura é renovada, retirando alguns exemplares de *L. minor*, lavando-os com água destilada num coador e transferindo-os de seguida para novos erlenmeyers contendo meio de cultura Steinberg. Todo o material usado na manutenção de culturas, ensaios e manuseamento da macroalga é devidamente esterilizado para o efeito.

**Tabela 1** – Composição do meio de cultura Steinberg (OCDE, 2006).

Composição das soluções	Quantidade de composto para a solução (g L <sup>-1</sup> )	Quantidade de solução a adicionar ao meio Steinberg (mL L <sup>-1</sup> )
<b>Solução 1</b>		
KNO <sub>3</sub>	17,5	20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,5	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,63	20
<b>Solução 2</b>		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5,0	1
<b>Solução 3</b>		
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	14,75	1
<b>Solução 4</b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	120,0	1
<b>Solução 5</b>		
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	180,0	1
<b>Solução 6</b>		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	44,0	1
<b>Solução 7</b>		
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	180,0	1
<b>Solução 8</b>		
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	760,0	1
EDTA Disódio desidratado	1500,0	

### Ensaio de inibição de crescimento de *Lemna minor*

Os ensaios de inibição do crescimento de *L. minor* decorreram segundo a norma padronizada: OECD 221 (2006). Os ensaios foram realizados com elutriados produzidos a partir das amostras de solo recolhidas. Os elutriados foram obtidos a partir de suspensões preparadas numa proporção de 1:4 (m/v) de solo para meio Steinberg. Os elutriados ficaram a agitar mecanicamente, no escuro, durante 12 h à temperatura ambiente e, de seguida, foram deixados em repouso durante 12 h para sedimentação das partículas de maiores dimensões. Após este período, os elutriados foram decantados e recolhida a porção sobrenadante. Esta porção sobrenadante foi testada através de ensaios de inibição de crescimento com a macroalga *L. minor*. Após ensaios preliminares para definir as concentrações a testar, para cada elutriado de solo foi testada uma gama de diluições que permitisse a determinação de um valor de IC<sub>50</sub> (diluição do elutriado que provoca uma inibição do crescimento da macroalga em 50%, relativamente ao controlo) e respectivo intervalo de confiança a 95%, para cada elutriado. Os ensaios decorreram em erlenmeyers previamente autoclavados e para cada diluição e controlo foram preparadas 3 réplicas. O ensaio iniciou-se

com a colocação de 3 plantas, com 3 frondes, em cada réplica. A exposição decorreu durante 7 dias, em condições idênticas às da manutenção da cultura (temperatura  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; fotoperíodo  $16 \text{ h}^{\text{L}}:8 \text{ h}^{\text{E}}$ ; intensidade luminosa de aproximadamente 10 000 lux). A determinação do peso seco inicial ( $P_{\text{inicial}}$ ) das plantas (após 12 h a  $60^{\circ}\text{C}$ ) foi efectuada em três réplicas independentes. No fim do ensaio, foi registado o peso seco (g) de *L. minor* em cada uma das concentrações e do controlo ( $P_{\text{final}}$ ).

A taxa de crescimento para cada uma das diluições e respectivas réplicas foi determinada, de acordo com a fórmula:

$$=(\ln(P_{\text{final}}) - \ln(P_{\text{inicial}}))/7$$

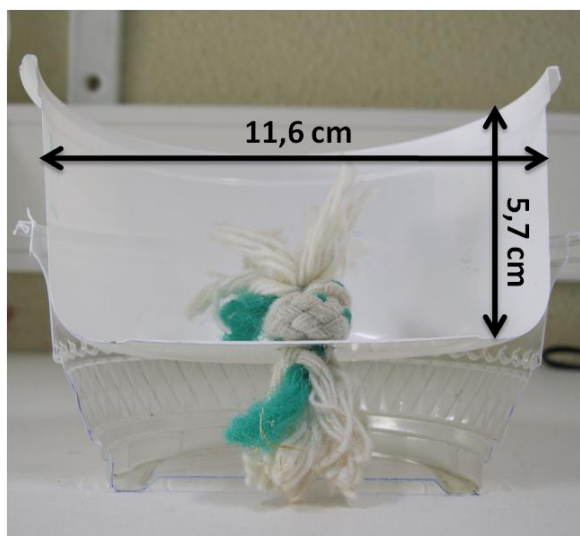
O parâmetro  $\text{IC}_{50}$  e correspondente intervalo de confiança a 95% foram determinados para cada solo através de análise de regressão não linear, ajustando uma equação logística aos dados através da técnica de *least squares*.

## **2.6. Ensaio de ecotoxicidade com *Zea mays***

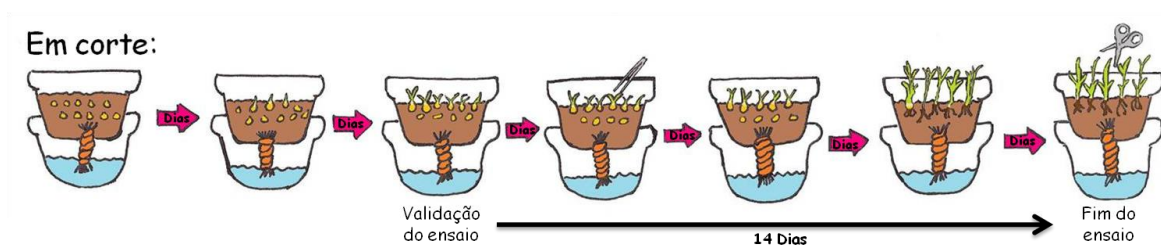
Os solos recolhidos na mina da Ervedosa foram submetidos a ensaios de fitotoxicidade (germinação e crescimento) com *Zea mays* (L) (milho), de acordo com o protocolo padronizado 11269-2 (ISO, 1995). Para o efeito, pesaram-se 200 g (peso seco) de cada um dos solos para caixas de plástico (com uma área de aproximadamente  $419 \text{ cm}^2$ ), previamente perfurados na base (Figura 5). Antes da colocação do solo, fez-se passar pelo orifício da base das caixas uma corda absorvente que permitisse um fluxo contínuo de água (por capilaridade) para o solo, mantendo, desta forma, o seu humedecimento durante o ensaio. A água foi adicionada a outra caixa de plástico, de diâmetro ligeiramente superior, que foi colocada na base (Figuras 3 e 4). Para cada solo foram efectuadas quatro réplicas e, em cada réplica, foram colocadas 10 sementes de milho. No início do ensaio, a água colocada na caixa da base continha uma solução de nutrientes (Substral<sup>®</sup> - Fertilizante para plantas na proporção de 1 tampa para 2 L de água de acordo com a recomendação do fabricante; Adubo NPK: 6-3-6; Azoto (N): 6%; Fosfato ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ): 3%; Potássio ( $\text{K}_2\text{O}$ ): 6%; Ferro (Fe): 0,03%; Oligoelementos: Cobre, Manganês, Molibdénio e Zinco). Deu-se início ao ensaio, colocando as



sementes no solo e expondo as caixas em condições controladas de temperatura ( $20 \pm 2$  °C), fotoperíodo ( $16\text{ h}^{\text{L}}: 8\text{ h}^{\text{E}}$ ) e intensidade luminosa (cerca de 25 000 lux). O ensaio foi observado diariamente, registrando-se em cada dia o número de emergências por caixa. Após emergência das primeiras 5 sementes, as seguintes foram retiradas cuidadosamente do sistema mas contabilizadas, ou seja, o ensaio de crescimento prosseguiu apenas para as primeiras 5 sementes emergidas. Ainda, e sempre que necessário, foi ajustado o volume de água no recipiente de base, ou aspergida água sobre as plantas, de modo a garantir as condições de humidade necessárias. Adicionalmente, foram preparadas quatro réplicas de solo controlo tendo-se utilizado para o efeito um solo padronizado OCDE (OCDE, 1984). O ensaio de crescimento teve início após a emergência de 50% das sementes no solo OCDE (ISO, 2005). Após se ter atingido este critério, o ensaio prolongou-se por mais 14 dias (Figura 6). No final do ensaio foi medida a fluorescência da clorofila *a*, na face adaxial da folha, em duas plantas de cada réplica. Para o efeito, escolheu-se sempre a folha exterior mais expandida. Após a medição destes parâmetros, as folhas foram recolhidas e armazenadas de acordo com o parâmetro a avaliar. Assim, para a quantificação da biomassa foi recolhida a porção aérea de uma planta de cada réplica, cortando-a imediatamente acima da superfície do solo. Para os restantes parâmetros analisados foram recolhidas folhas individualizadas em cada réplica e imediatamente processadas para o conteúdo hídrico e permeabilidade da membrana; ou congeladas em azoto líquido para posterior quantificação de clorofilas, carotenóides, prolina e conteúdo em malondialdeído (ver abaixo descrição dos parâmetros).



**Figura 5** – Fotografia em corte do sistema utilizado para o ensaio com *Z. mays*.



**Figura 6** – Esquema do sistema utilizado para o ensaio de *Z. mays*.

### Emergências e biomassa aérea

As emergências foram verificadas e registadas diariamente até ao final do ensaio. A biomassa fresca (g) foi medida logo após o corte da planta (1 por réplica). A biomassa seca (g) foi determinada colocando a planta a secar na estufa a 60°C até estabilização do peso.

### Conteúdo hídrico

O conteúdo hídrico foi determinado retirando uma folha em cada réplica ( $n=4$  para cada solo). Cada folha foi pesada numa balança analítica ( $P_{\text{fresco}}$ ) e, de seguida, imersa em água destilada num tubo e deixada no escuro, a 4°C, durante aproximadamente 12 h. Após este período, a folha foi retirada da água e colocada sobre um papel absorvente, de modo a remover o excesso de água, e posteriormente pesada para determinação do peso túrgido ( $P_{\text{túrgido}}$ ). Após a determinação do peso túrgido, as folhas foram colocadas numa estufa a 60°C até

à estabilização do peso ( $P_{\text{seco}}$ ). O conteúdo hídrico do material vegetal (CH) foi determinado, de acordo com a seguinte equação:

$$CH = [(P_{\text{fresco}} - P_{\text{seco}})/(P_{\text{turgido}} - P_{\text{fresco}})] \times 100$$

### **Pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides)**

A quantificação de clorofilas (*a* e *b*) e carotenóides foi determinada segundo o método descrito por Sims e Gamon (2002). Num almofariz foi colocada uma amostra de tecido vegetal (aproximadamente 0,5 g) que foi homogeneizado em 2 ml de solução fria de acetona/tampão Tris [50 mM] (80:20) (v/v) (99% Absolve®/ 99,8% Merck®). A suspensão resultante foi transferida para tubos de centrífuga, homogeneizada no vórtex (durante cerca de 30 seg.), e centrifugada a 4000 rpm durante 5 min. a 10°C. O sobrenadante foi recolhido para novos tubos que foram armazenados no escuro. Para os tubos com pellet adicionou-se 1,5 ml de acetona/Tampão Tris e repetiu-se o procedimento. O sobrenadante resultante foi recolhido para os tubos conservados no escuro onde se fez o volume com acetona/Tampão Tris até um volume final de 6 ml.

A quantificação de clorofilas (*a* e *b*) e carotenóides foi efectuada através do doseamento por espectrofotometria (Thermo Scientific™ 10S Vis spectrophotometer), a 663 nm, 537 nm, 647 nm e 470 nm, utilizando-se como branco a acetona/Tampão Tris. A concentração de clorofilas *a* e *b* e carotenóides foi calculada segundo as equações:

$$Chl_a = 0,01373 A_{663} - 0,000897 A_{537} - 0,003046 A_{647}$$

$$Chl_b = 0,02405 A_{647} - 0,004305 A_{537} - 0,005507 A_{663}$$

$$\text{Carotenóides} = ((A_{470} - (17,1 \times (Chl_a + Chl_b) - 9,479 \times \text{antocianinas})) / 119,26$$

Para determinar os carotenóides foi necessário utilizar a seguinte equação, relacionada com a correcção para as antocianinas:

$$\text{Antocianinas} = 0,08173 A_{537} - 0,00697 A_{647} - 0,002228 A_{663}$$

Para o cálculo da Clorofila *a+b*, procedeu-se ao somatório das clorofilas quantificadas:

$$\text{Chl } a+b = \text{Chl}_a + \text{Chl}_b$$

### **Fluorescência da clorofila *a* (Fv/Fm e $\Phi\text{PSII}$ )**

Para as medições de fluorescência seguiu-se o protocolo de Maxwell e Johnson (2000) e utilizou-se um fluorímetro portátil – MiniPam, Walz (Alemanha). Os componentes da fluorescência da clorofila relacionados com a luz, como o rendimento basal (F), a fluorescência máxima na luz (F'm) e o rendimento quântico do fotossistema II (PSII) [ $\Phi\text{PSII}$ , equivalente a (F'm - F)/F'm] foram determinados.

As plantas foram depois adaptadas ao escuro (com o auxílio de pinças), durante cerca de 20 min. A fluorescência mínima (F<sub>0</sub>) foi medida com todos os centros de reacção do fotossistema II (PSII) abertos com irradiação modulada suficientemente baixa (<0,1  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), de modo a não induzir qualquer variação significativa da fluorescência. A fluorescência máxima (F<sub>m</sub>) foi medida com todos os centros de reacção do fotossistema II fechados através de um pulso de luz actínica (0,8 s a 8000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) em folhas adaptadas ao escuro. A partir destas medições calculou-se o valor Fv/Fm [equivalente a (F<sub>m</sub>-F<sub>0</sub>)/F<sub>m</sub>] – eficiência fotossintética máxima do fotossistema II (Dias e Brüggemann, 2010).

### **Permeabilidade da membrana**

A permeabilidade da membrana (Lutts et al., 1996) foi determinada nas plantas expostas aos diferentes solos, após recolha de uma folha de uma planta em cada réplica. A folha foi pesada e lavada com água ultra-pura, de seguida foi colocada num frasco de plástico com água ultra-pura de modo a imergir todo o tecido vegetal. Os frascos foram colocados a agitar mecanicamente durante cerca de 12 h. No dia seguinte, foi medida a condutividade da solução (C<sub>inicial</sub>) com o auxílio de um condutivímetro (CONSORT C830 – Multi-parameter analyser), seguida da autoclavagem dos frascos contendo as folhas em suspensão, durante 10 min, a 121°C. Após arrefecimento, a condutividade da solução (C<sub>final</sub>) foi medida novamente. A permeabilidade da membrana foi calculada através do rácio das condutividades C<sub>inicial</sub>/C<sub>final</sub> e expressa em percentagem.

### **Prolina**

Para a quantificação do conteúdo em aminoácido prolina foi recolhido tecido vegetal de uma planta de cada réplica. Foram utilizadas cerca de 100 mg de material vegetal, que foi homogeneizado em 1,5 ml de ácido sulfosalicílico (100,2%, Sigma<sup>®</sup>) a 3%. Após centrifugação a 4000 rpm recolheu-se 100 µL do sobrenadante e adicionaram-se 2 ml de ácido acético glacial (*pro analysis*, Panreac<sup>®</sup>) e 2 ml de ninidrina (Riedel-de Haën<sup>®</sup>). De seguida, incubaram-se os extractos num banho de água a 100°C durante 1 h, após este período o material foi colocado em gelo. Após arrefecimento e na hote, foi adicionado 1 ml de tolueno (99,9%, Merck<sup>®</sup>) aos tubos. Foram efectuadas leituras a 520nm à fase cromófora da solução (Khedr et al., 2003). A quantidade de prolina foi determinada segundo uma recta de calibração efectuada com padrões de 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125 mg mL<sup>-1</sup> de prolina ( $y = 0,2441x + 0,0931$ ;  $r^2=0,9782$ ).

### **Conteúdo em Malondialdeído (MDA)**

O conteúdo em malondialdeído (MDA) nas amostras de tecido vegetal foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Elkahoui et al. (2005), de forma a avaliar de forma indirecta a ocorrência de peroxidação lípidica das células vegetais, na medida em que o MDA é um produto final deste processo. Para determinar o conteúdo de MDA, pesaram-se amostras de tecido vegetal com cerca de 0,5 g, que foram homogeneizadas num almofariz com 5 ml de ácido tricloroacético (TCA a 0,1% p/v (g/100 ml) (Riedel-de Haën<sup>®</sup>). Os homogeneizados foram centrifugados a 4000 rpm, a 4°C durante 5 min. De seguida, retiraram-se alíquotas de 1ml do sobrenadante para tubos falcon (15 ml) e adicionaram-se 4 ml de TCA (20% (m/v)), contendo 0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) (≥98%, Sigma-Aldrich). Os tubos foram colocados num banho de água a 95°C, durante 30 min., arrefecendo-se de seguida em gelo. Posteriormente, os extractos foram centrifugados a 4000 rpm, a 4°C, durante 10 min. Com os sobrenadantes obtidos, foi lida a absorvância específica a 532 nm e a absorvância não específica a 600 nm, utilizando-se como branco, água destilada. A concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção molar  $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  e a seguinte equação:

$$\text{MDA} = (A_{532} - A_{600}) / 0,155$$

### **Análise estatística**

De forma a verificar a existência de diferenças significativas nos parâmetros avaliados nas plantas expostas aos diferentes solos, foram realizadas análises de variância (ANOVA) de uma via. Verificou-se o cumprimento dos pressupostos da ANOVA. Sempre que os resultados desta análise apresentaram diferenças estatísticas para um nível de significância  $p < 0,05$ , foi executado um teste de comparações múltiplas de Dunnett, de forma a comparar os parâmetros medidos em cada um dos solos com os valores registados para o solo referência (Zar, 1996).



## Resultados

---





### **3. Resultados**

#### **3.1. Parâmetros físico-químicos**

A tabela 2 apresenta os valores registados para os diferentes parâmetros físico-químicos avaliados em cada amostra de solo recolhida na mina de Ervedosa. De um modo geral, os solos apresentaram baixos valores de pH (inferiores a 4,6) e de condutividade. O solo F1 destacou-se por apresentar o valor mais baixo de  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  (3,4) e o valor mais elevado de condutividade ( $290,33 \mu\text{S cm}^{-1}$ ). Relativamente ao conteúdo em matéria orgânica (MO) e de acordo com USEPA (2004), os solos agrupam-se em: i) baixo teor em MO ( $<2\%$ ) - solos D2, E1 e F3; ii) teor de MO intermédio ( $2\% \leq \text{MO} < 6\%$ ) - solos REF, C1, C3, D1, D3, D4, E2, F1 e F2 e iii) elevado teor de MO ( $\geq 6\%$ ) - solos C2, C4, E3, E4 e F4. O solo E4 destacou-se por apresentar o teor mais elevado em matéria orgânica (19,7%) e de capacidade de retenção da água (84,6%).

**Tabela 2** – Valores dos parâmetros físico-químicos medidos: pH<sub>KCl</sub>, condutividade, MO – matéria orgânica e CRA – capacidade de retenção da água das amostras de solo. A negrito destaca-se os valores mais elevados registados para cada um dos parâmetros.

	pH <sub>KCl</sub>	Condutividade (μS cm <sup>-1</sup> )	MO (%)	CRA (%)
REF	4,6 ± 0,02	51,1 ± 0,76	3,8 ± 0,4	22,5 ± 0,1
C1	3,8 ± 0,02	35,7 ± 0,41	4,4 ± 0,4	38,6 ± 0,6
C2	4,6 ± 0,66	36,7 ± 0,5	9,8 ± 0,3	57,7 ± 0,5
C3	4,0 ± 0,01	25,8 ± 1,34	5,6 ± 0,3	40,1 ± 2,3
C4	4,1 ± 0,01	35,1 ± 0,31	7,7 ± 0,2	52,8 ± 0,9
D1	4,0 ± 0,01	34,0 ± 4,40	4,4 ± 0,0	62,5 ± 12,5
D2	4,4 ± 0,01	19,5 ± 3,64	1,3 ± 0,1	8,9 ± 0,1
D3	4,0 ± 0,02	41,0 ± 2,77	2,4 ± 0,3	35,4 ± 0,3
D4	4,4 ± 0,02	12,2 ± 0,41	4,9 ± 0,1	23,3 ± 0,1
E1	4,3 ± 0,01	7,5 ± 0,07	1,6 ± 0,5	34,3 ± 2,4
E2	4,3 ± 0,00	20,0 ± 0,29	5,4 ± 0,3	40,8 ± 1,8
E3	3,8 ± 0,04	22,8 ± 0,98	10,9 ± 0,4	66,3 ± 0,9
E4	3,8 ± 0,01	40,0 ± 7,76	<b>19,7 ± 0,3</b>	<b>84,6 ± 2,1</b>
F1	<b>3,4 ± 0,04</b>	<b>290,3 ± 7,75</b>	2,0 ± 0,1	27,9 ± 1,0
F2	3,6 ± 0,05	54,3 ± 12,81	3,0 ± 0,3	33,1 ± 3,9
F3	4,0 ± 0,01	16,3 ± 0,33	1,5 ± 0,1	31,8 ± 0,4
F4	4,1 ± 0,01	32,3 ± 0,67	6,7 ± 0,2	46,8 ± 3,4

### 3.2. Concentrações totais e extraíveis de metais no solo

O conteúdo em metais, quantificado nos diferentes solos, com base em dois processos de extracção (cloreto de cálcio e *aqua regia*) é apresentado na tabela 3. Na generalidade, as concentrações mais elevadas de metais foram registadas nos solos dos segmentos D, E e F, com excepção do alumínio, manganês e ferro que, de um modo geral, estiveram presentes em concentrações elevadas em todos os solos, incluindo no solo de REF. O solo D1 foi aquele que apresentou valores mais elevados de P, Mn, Fe e Cu, para as concentrações extraíveis com CaCl<sub>2</sub>. O solo F1 apresentou teores de As elevados, quando comparado com os restantes solos.

## Resultados

**Tabela 3** – Concentração média de metais nos solos de acordo com diferentes métodos de extracção: extracção com cloreto de cálcio (0,01M) e extracção com *aqua regia*. A negrito encontram-se os valores mais altos registados para cada metal e a sublinhado o valor mais baixo. ILD – inferior ao limite de detecção.

	Al	Pb	P	V	Mn	Fe	Cu	Zn	As	Sb	Ba	Sn
<b>Extracção por <i>Aqua regia</i> (g Kg<sup>-1</sup>)</b>												
REF	14886,3	27,6	208,6	24,3	132,8	13722,7	26,0	37,4	61,3	0,3	35,8	1,8
C1	9700,0	26,3	199,8	13,5	114,8	22884,8	14,2	46,2	158,7	3,8	19,7	2,3
C2	1963,1	2,5	30,9	ILD	12,9	1152,7	1,2	ILD	<u>0,1</u>	<u>0,1</u>	4,2	0,7
C3	6943,8	21,4	304,0	8,6	53,6	18795,6	11,3	17,6	33,9	2,4	23,2	1,2
C4	865,2	<u>1,2</u>	<u>16,2</u>	ILD	5,8	<u>628,8</u>	<u>1,1</u>	ILD	ILD	ILD	<u>1,7</u>	<u>0,4</u>
D1	4281,7	34,8	<b>4604,0</b>	<u>0,8</u>	<b>1448,3</b>	33536,0	<b>604,8</b>	243,1	3163,5	2,5	13,7	2,5
D2	5056,5	<b>215,7</b>	1344,2	<b>42,5</b>	92,6	16047,8	140,2	68,6	867,6	2,5	31,2	5,5
D3	6916,2	50,2	753,0	36,1	199,6	17220,8	67,0	52,6	323,5	2,6	12,6	2,9
D4	<b>17825,2</b>	30,1	438,8	31,4	538,5	29942,0	128,8	93,5	255,2	2,6	30,6	3,3
E1	12777,5	20,4	223,4	47,6	735,5	25414,9	477,7	232,5	439,4	0,8	27,7	1,5
E2	13752,6	33,9	194,5	22,3	139,6	22676,5	28,6	58,1	68,9	0,8	32,2	3,3
E3	<u>764,1</u>	1,5	31,9	ILD	<u>5,4</u>	1334,4	<u>1,1</u>	ILD	0,3	ILD	1,8	ILD
E4	9675,9	82,7	1227,8	17,2	333,3	<b>45944,2</b>	44,3	<b>461,5</b>	367,4	7,4	<b>97,6</b>	16,2
F1	1084,7	79,2	323,5	ILD	18,0	8348,6	7,9	<u>4,7</u>	<b>15251,8</b>	66,0	61,2	69,7
F2	4044,7	144,7	267,8	17,1	37,2	22555,8	23,0	19,0	13742,9	<b>195,4</b>	46,8	<b>82,1</b>
F3	2099,4	56,0	299,1	1,7	17,7	9634,3	45,2	27,0	7969,1	32,4	30,8	32,7
F4	8754,2	27,4	231,3	12,9	208,7	18965,6	18,2	37,0	47,3	0,8	24,4	1,7
<b>Extracção por CaCl<sub>2</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>												
REF	0,70	<u>0,00</u>	<u>0,01</u>	ILD	0,15	0,06	<u>0,00</u>	0,04	<u>0,00</u>	ILD	0,17	ILD
C1	2,55	0,01	0,02	ILD	0,73	0,12	<u>0,00</u>	0,06	0,01	ILD	0,03	ILD
C2	1,63	0,01	<u>0,01</u>	ILD	3,07	0,12	<u>0,00</u>	0,09	<u>0,00</u>	ILD	0,14	ILD
C3	2,49	0,01	<u>0,01</u>	ILD	0,26	0,08	<u>0,00</u>	0,03	<u>0,00</u>	ILD	0,06	ILD
C4	<b>3,19</b>	0,01	0,02	ILD	0,66	0,22	0,01	0,03	<u>0,00</u>	ILD	0,09	ILD
D1	1,38	<u>0,00</u>	<b>0,20</b>	ILD	<b>3,53</b>	<b>0,60</b>	<b>3,11</b>	1,10	0,09	ILD	<u>0,01</u>	ILD
D2	1,50	<u>0,00</u>	0,04	ILD	0,44	0,09	0,11	0,07	0,02	ILD	<u>0,01</u>	ILD
D3	2,72	<u>0,00</u>	0,02	ILD	0,50	0,18	0,08	0,15	0,01	ILD	<u>0,01</u>	ILD
D4	2,10	<u>0,00</u>	0,05	ILD	0,60	0,33	0,18	0,19	0,01	ILD	0,06	ILD
E1	2,63	<u>0,00</u>	ILD	ILD	0,24	<u>0,04</u>	0,55	0,29	<u>0,00</u>	ILD	0,06	ILD
E2	1,32	0,01	<u>0,01</u>	ILD	0,47	0,13	0,00	0,04	<u>0,00</u>	ILD	0,06	ILD
E3	1,46	0,01	ILD	ILD	1,14	0,15	0,01	0,04	<u>0,00</u>	ILD	0,06	ILD
E4	1,06	<u>0,00</u>	ILD	ILD	0,59	0,25	<u>0,00</u>	0,08	<u>0,00</u>	ILD	0,11	ILD
F1	0,81	0,01	0,06	ILD	0,04	0,07	0,01	<u>0,01</u>	<b>77,49</b>	ILD	0,25	ILD
F2	1,51	<u>0,00</u>	ILD	ILD	0,16	0,14	0,01	0,03	0,32	ILD	0,03	ILD
F3	0,64	<u>0,00</u>	<u>0,01</u>	ILD	0,11	0,10	0,01	0,05	0,27	ILD	<u>0,01</u>	ILD
F4	<u>0,63</u>	0,01	0,17	ILD	0,60	0,42	0,01	<b>1,89</b>	0,03	ILD	<b>0,26</b>	ILD

### 3.3. *Lemna minor*

Os valores de  $IC_{50}$  e correspondentes limites de confiança a 95%, para o crescimento de *L. minor*, foram determinados através de análise de regressão não linear, ajustando uma equação logística aos dados através da técnica de *least squares* (OCDE, 2006) e encontram-se representados na tabela 4. Apenas os elutriados dos solos D1, D2, D3, E1, F1, F2 e F3 provocaram uma inibição no crescimento da macroalga *Lemna minor*. No entanto apresentaram valores de toxicidade bastante diferentes, sendo sobretudo os obtidos a partir dos solos D1, E1 e F1, os que demonstraram ser mais tóxicos (menores valores de  $IC_{50}$ ). É de destacar que para cada um destes segmentos os pontos com a numeração de 1, são os que se encontram mais próximos da zona de exploração.

**Tabela 4** – Valores de  $IC_{50}$  e respectivos intervalos de confiança a 95%, determinados para *Lemna minor*. NT - Sem toxicidade.

	$IC_{50}$
REF	NT
C1	NT
C2	NT
C3	NT
C4	NT
D1	2,77 < 4,28 < 5,79
D2	37,92 < 57,03 < 76,15
D3	60,21 < 87,36 < 114,5
D4	NT
E1	17,12 < 24,66 < 32,19
E2	NT
E3	NT
E4	NT
F1	0,19 < 0,22 < 0,25
F2	23,75 < 55,67 < 87,58
F3	31,93 < 45,18 < 58,43
F4	NT

### 3.4. Germinação, crescimento e performance de *Zea mays*

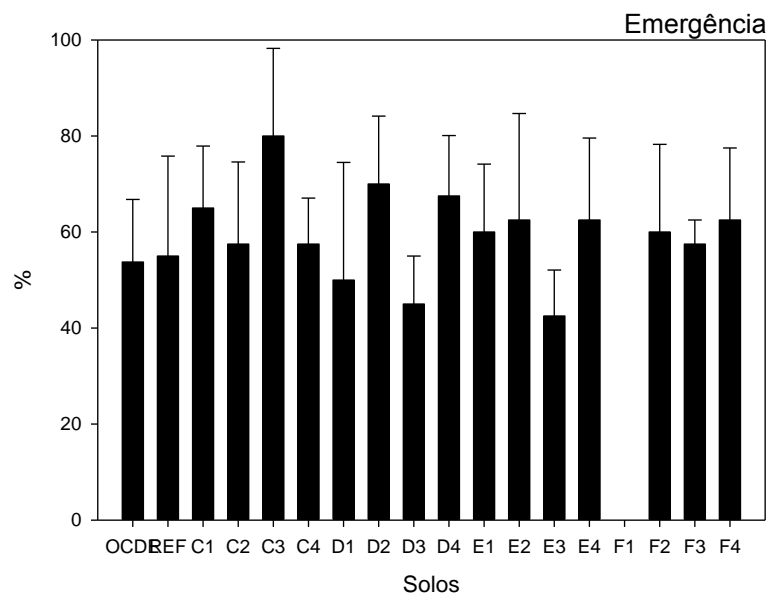
Os resultados obtidos no ensaio de germinação e crescimento de *Zea mays* estão apresentados nas figuras 5, 6, 7, 8 e 9 e nas tabelas 5. Note-se que no solo F1 não foram registadas emergências, pelo que não existem dados relativos a este solo. No ensaio de emergência e crescimento de *Z. mays*, em que se utilizou o solo OCDE como controlo, pretendeu-se validar o solo natural REF como um solo referência. Em todos os parâmetros avaliados (percentagem de emergência, biomassa aérea, conteúdo hídrico, clorofila *a+b*, carotenóides, Fv/Fm,  $\Phi$ PSII e prolina) não se observaram diferenças significativas entre o solo OCDE e o solo REF.

No que refere à emergência de sementes e à biomassa aérea, parâmetros previstos no protocolo padronizado 11269-2 (ISO, 1995), verificou-se que a biomassa foi significativamente reduzida no solo D1, enquanto que no solo OCDE foi registado o oposto, comparativamente ao solo de REF (Figura 8, tabela 5). Quanto à percentagem de emergências, não se verificaram diferenças significativas entre os solos testados (Figura 7). Porém, o solo C3 apresentou uma percentagem de emergência superior, comparativamente ao solo REF. Contudo, e apesar de a performance das plantas no solo de referência natural ter sido inferior ao do solo artificial, o ensaio foi validado para o solo OCDE de acordo com os critérios definidos no protocolo padronizado 11269-2 (ISO, 1995). De um modo geral, as plantas que cresceram nos solos dos segmentos E e F apresentaram valores de biomassa aérea mais baixos, contudo as diferenças não foram significativas (Figura 8). Diferenças estatisticamente significativas entre solos foram registadas para os parâmetros conteúdo hídrico, clorofila *a+b*, carotenóides, Fv/Fm e  $\Phi$ PSII e prolina (Tabela 5). Os parâmetros conteúdo hídrico, eficiência fotoquímica máxima e rendimento da planta foram os mais sensíveis, na medida em que foram aqueles que revelaram uma diminuição significativa, relativamente ao solo REF para plantas expostas, num maior número de solos, dos quatro segmentos (Figura 8 e 10). No que refere ao conteúdo em carotenóides e clorofila *a+b*, as diferenças significativas registadas estiveram sempre associadas a um aumento destes parâmetros relativamente ao solo de referência natural (Figura 9).

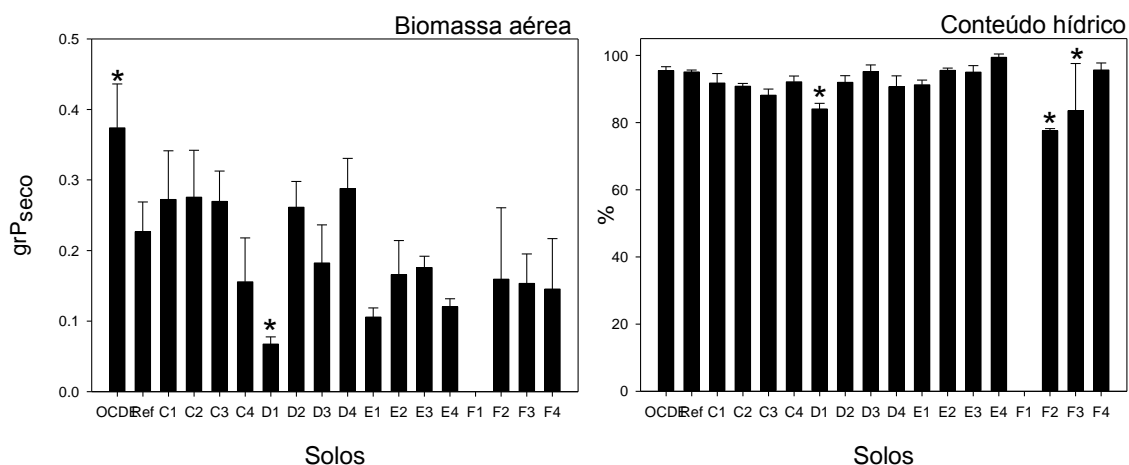
Os parâmetros indicadores de performance medidos nas plantas expostas aos diferentes solos estão representados na Figura 9. Não foram registadas diferenças significativas para a permeabilidade da membrana e para o conteúdo em MDA, pois dada a variabilidade entre as plantas expostas a cada um dos solos, o teste de Dunnett não conseguiu identificar quais os solos que diferiam do solo de REF. Contudo, as plantas expostas aos solos C1, C3 e F4 apresentaram valores claramente inferiores de permeabilidade da membrana, comparativamente às expostas ao solo REF. E por oposição, apenas os solos C1, C2 e C3 apresentaram um valor superior de conteúdo em MDA, comparativamente ao solo de referência, dada a menor variabilidade dos resultados registados, dentro de cada tratamento. Contudo, tal como já foi referido, esta diferença não foi significativa com base no teste de Dunnett ( $p>0,05$ ). Não foram registadas diferenças significativas no conteúdo em prolina, entre as plantas expostas aos diferentes solos da mina de Ervedosa, apesar de na análise de variância (ANOVA)  $p<0,001$  e existir grande variabilidade entre os solos, não existe variabilidade em comparação com o solo REF.

**Tabela 5** – Tabela resumo das análises de variância (ANOVA) de uma via efectuadas para os diferentes parâmetros.

Variável	F	g. l.	p
<b>Emergência</b>	1,383	16, 55	<b>0,185</b>
<b>Biomassa</b>	8,175	16, 33	<b>&lt;0,001</b>
<b>Conteúdo hídrico</b>	5,937	16, 38	<b>&lt;0,001</b>
<b>Clorofila a+b</b>	6,292	16, 39	<b>&lt;0,001</b>
<b>Carotenóides</b>	4,832	16, 39	<b>&lt;0,001</b>
<b>Fv/Fm</b>	5,445	16, 120	<b>&lt;0,001</b>
<b>ΦPSII</b>	4,574	16, 119	<b>&lt;0,001</b>
<b>Permeabilidade da membrana</b>	1,966	16, 35	<b>0,047</b>
<b>Conteúdo em Malondialdeído (MDA)</b>	2,431	16, 40	<b>0,012</b>
<b>Prolina</b>	6,371	16, 35	<b>&lt;0,001</b>

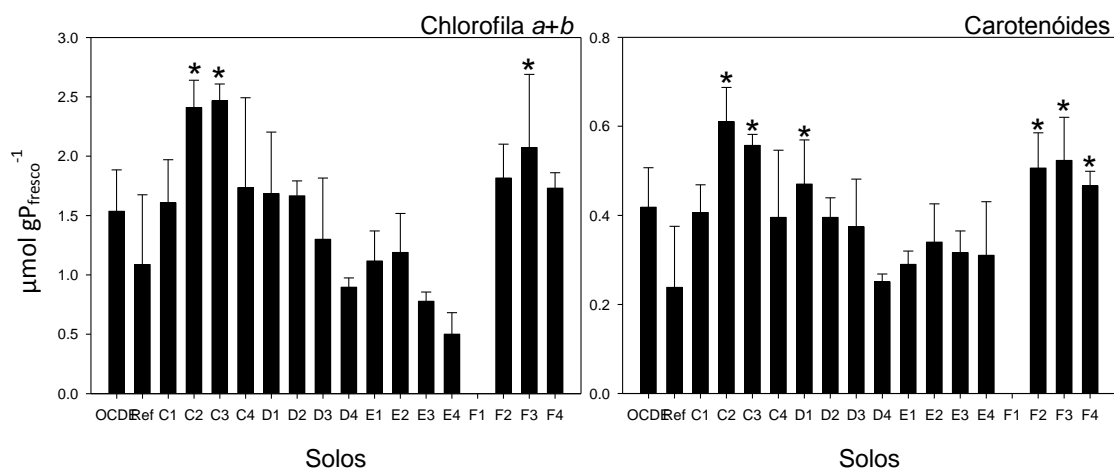


**Figura 7** – Percentagem de emergências do ensaio de *Zea mays*. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

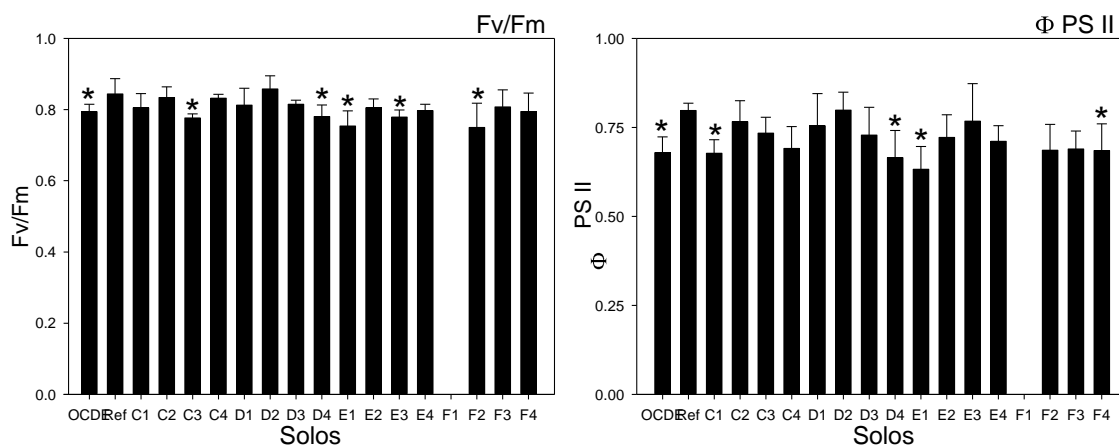


**Figura 8** – Biomassa aérea e conteúdo hídrico nas plantas expostas aos diferentes solos recolhidos na área da mina de Ervedosa e ao solo artificial OCDE. As barras de erro correspondem ao desvio padrão e os \* correspondem às diferenças significativas (Teste Dunnett  $p \leq 0,001$ ).

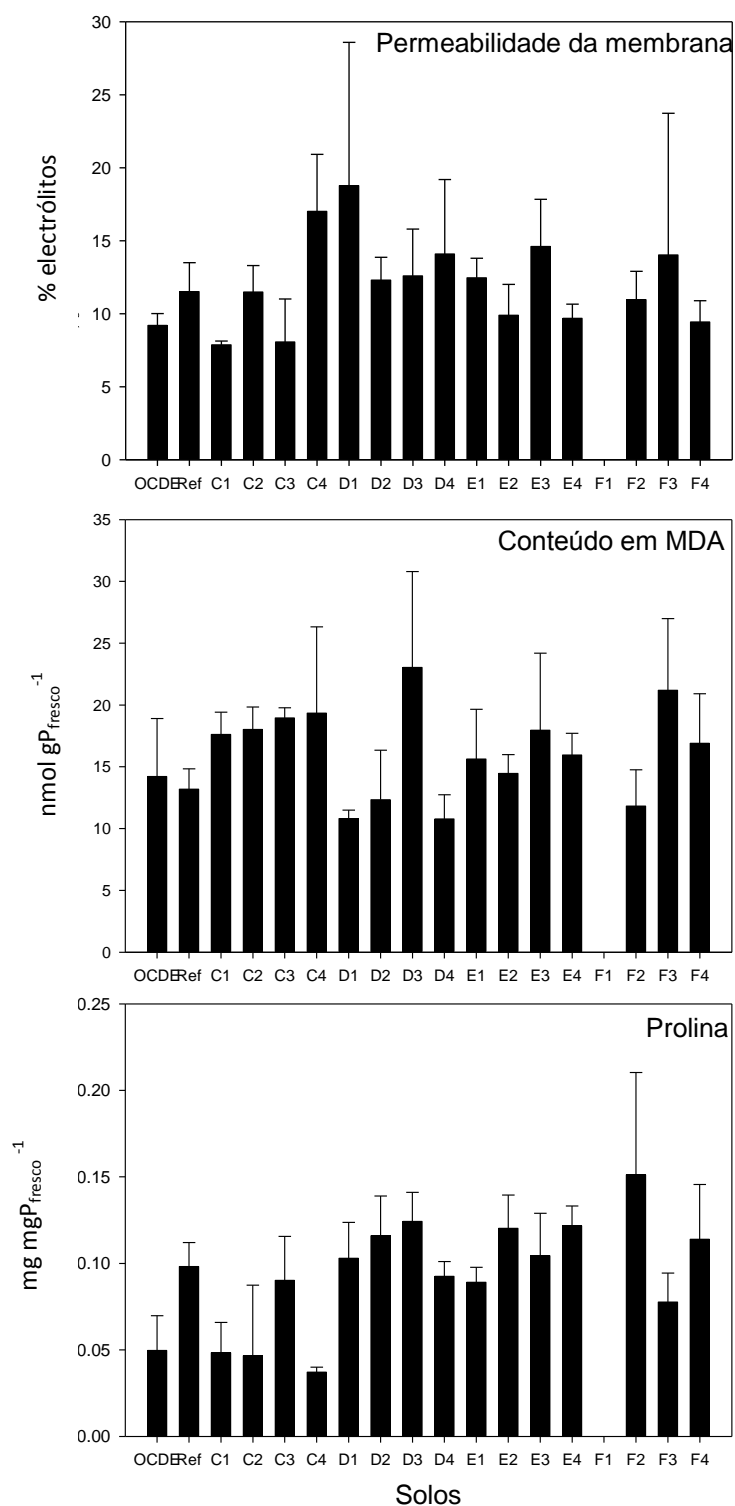




**Figura 9** – Pigmentos: conteúdo em clorofila *a+b* e em carotenóides das plantas expostas aos diferentes solos recolhidos na área da mina de Ervedosa e ao solo artificial OCDE. As barras de erro correspondem ao desvio padrão e os \* correspondem às diferenças significativas (Teste Dunnett  $p \leq 0,001$ ).



**Figura 10** – Parâmetros de fluorescência: eficiência fotoquímica máxima (Fv/Fm) e rendimento da planta (ΦPSII) nas plantas expostas aos diferentes solos recolhidos na área da mina de Ervedosa e ao solo artificial OCDE. As barras de erro correspondem ao desvio padrão e os \* correspondem às diferenças significativas (Teste Dunnett  $p \leq 0,001$ ).



**Figura 11** – Indicadores de *stress*: permeabilidade da membrana, conteúdo em malondialdeído (MDA) e prolina, nas plantas expostas aos diferentes solos recolhidos na área da mina de Ervedosa e ao solo artificial OCDE. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.



## Discussão

---



#### 4. Discussão

O presente estudo teve como objectivo avaliar a fitotoxicidade de solos recolhidos na mina de Ervedosa, uma área mineira abandonada, localizada no Norte do país (Vinhais, Bragança, Portugal), onde no passado foi efectuada a extracção de minério de estanho e de arsénio. Para o efeito, realizaram-se ensaios com plantas que permitiram avaliar, por um lado a capacidade de *habitat* e de produção de biomassa destes solos e por outro a sua capacidade para reter os contaminantes. Esta avaliação foi feita através de ensaios padronizados para testar solos e elutriados, que utilizam como parâmetros de medição, a germinação e o crescimento de espécies terrestres e aquáticas, respectivamente.

Os ensaios com plantas aquáticas e terrestres são de extrema importância na análise de risco ecológico, pois estas espécies são componentes essenciais do ecossistema, são produtores primários de O<sub>2</sub> e a fonte primária de alimento dos organismos heterotróficos. A integração de ensaios com plantas na ARE torna-se vantajosa, uma vez que as plantas encontram-se constantemente expostas aos xenobióticos, devido à sua incapacidade de fuga (Verkleij, 1994).

Na avaliação da fitotoxicidade dos elutriados de solos recolhidos na área mineira de Ervedosa, utilizou-se a espécie *Lemna minor*. Esta espécie está já considerada por vários autores, em diversos estudos, como sendo um promissor bioindicador de alterações nos ecossistemas aquáticos (Wang, 1986; Kiss et al., 2003; OCDE, 2006; Horvat et al., 2007). Tal como seria de esperar, os solos mais próximos da área de exploração mineira (D1, E1 e F1) foram os que apresentaram elutriados com um nível de toxicidade muito elevado. No caso particular dos solos F1 e D1, estes caracterizam-se por apresentarem níveis elevados de As e Cu, respectivamente, extraíveis por cloreto de cálcio, o que sugere que estes poderão ter sido os principais metais a estarem disponíveis para passarem para a fase aquosa e para exercerem efeitos tóxicos em *Lemna minor*. No caso do solo D1, o Al, o Zn e o Cu, em conjunto, podem ter contribuído para a elevada toxicidade deste solo. Segundo Teisseire et al. (1998), o cobre é um metal bastante tóxico para *Lemna minor*, sendo o IC<sub>50</sub> registado de 0,16 mg L<sup>-1</sup> o que sugere que, no presente trabalho, a toxicidade dos solos D1 e E1 para *L. minor*, poderá ter resultado, entre outros, da presença de Cu nos elutriados acima

do valor de  $IC_{50}$ , como pode ser inferido a partir da concentração deste metal extraída com cloreto de cálcio. Horvat et al. (2007), por sua vez, verificaram igualmente o efeito inibidor no crescimento de *Lemna minor* de um efluente resultante de uma indústria de cromagem, rico em Cu, Cr, Pb, Zn e Fe, o que reforça, igualmente, a sensibilidade desta espécie a misturas metálicas. Ainda com menor toxicidade, os elutriados dos solos dos pontos 2 e 3 dos segmentos D e F demonstraram, igualmente, um efeito inibidor no crescimento de *L. minor*. Sendo estes segmentos aqueles que se estendem desde a zona de exploração até ao Rio Tuela e paralelamente a este mesmo rio, respectivamente. Tal facto levanta algumas preocupações, na medida em que os resultados obtidos sugerem que poderá estar a haver uma fraca retenção dos solos próximos deste curso de água, contribuindo para a mobilização de uma mistura de metais, que terá impactos no ecossistema aquático. Esta suspeita justifica que se leve a cabo uma monitorização mais detalhada deste curso de água.

Os ensaios com plantas terrestres são recomendados na avaliação da qualidade do solo devido à sua relevância ecológica (Verkleij, 1994; ISO, 1995; Weeks et al., 2004). No entanto e de modo a obter informação sobre a sensibilidades de diferentes espécies, é proposto pelos protocolos padronizados, que estes ensaios sejam realizados com pelo menos uma espécie de cada classe de plantas angiospérmicas: as monocotiledóneas e as dicotiledóneas (ISO, 1995; Weeks et al., 2004). Neste estudo, foi apenas utilizada a espécie *Zea mays* (monocotiledónea) (ISO, 1995), e definiu-se que o objectivo inicial não seria apenas determinar a fitotoxicidade dos solos da área mineira em estudo, mas também validar a sensibilidade de outros parâmetros bioquímicos e de fluorescência das plantas, comparativamente aos propostos nos protocolos padronizados.

Vários autores já demonstraram que os efeitos de xenobióticos em plantas terrestres podem ser medidos e analisados de várias formas em diferentes órgãos (pois as plantas podem estar expostas a xenobióticos através dos estomas, da superfície foliar e das raízes) e ao longo dos vários estádios do ciclo de vida (Bedell et al., 2006). Neste estudo e de acordo com os parâmetros de avaliação

recomendados no protocolo ISO 11269-2 (ISO, 1995), foi medida a biomassa aérea e a percentagem de emergências das plantas expostas aos solos mineiros.

Com base nestes parâmetros, verificou-se que a emergência de sementes não foi um parâmetro sensível a nenhum dos solos avaliados, na medida em que o factor solo não teve um efeito significativo no mesmo. Apenas o solo F1 constituiu uma excepção, na medida em que inibiu de forma absoluta a germinação de sementes e, por conseguinte, a avaliação de qualquer outro parâmetro. Este solo caracteriza-se por apresentar, entre outros metais, uma concentração de arsénio extremamente elevada, sendo superior ao critério de qualidade canadiano proposto para este elemento em solos agrícolas ( $12 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) (CCME, 2001), pelo que tal efeito era, de certa forma, esperado. Adicionalmente, com base na avaliação dos extractos obtidos com cloreto de cálcio, este elemento parece estar biodisponível neste solo, o que contribui, igualmente, para a sua capacidade de exercer efeitos tóxicos. Não obstante tal facto, a falta de sensibilidade da germinação à contaminação da matriz solo com metais, foi já reportada por diversos autores (e.g. Bedell et al., 2006; Pereira et al., 2009; Chapman et al., 2010). A título de exemplo, Corrêa et al. (2006) verificaram que a germinação foi o parâmetro menos sensível à exposição com Cd, na medida em que este apenas foi afectado por concentrações superiores a 800, 3200 e  $400 \text{ mg Kg}^{-1}$  de solo seco, em aveia, couve chinesa e alface, respectivamente. Contudo, e ainda que a cobertura das sementes confira protecção ao embrião, o nível de protecção depende da espécie e também do metal (Kranter e Colville, 2011), pelo que nada poderia ser concluído sobre a fitotoxicidade deste solo, com base apenas num único ensaio com uma espécie terrestre e com base na avaliação deste parâmetro.

No que refere ao parâmetro crescimento, igualmente previsto no protocolo padronizado, apenas foi significativamente inibido nas plantas expostas ao solo D1. Tal facto não era esperado, dado o elevado nível de metais encontrados nalguns dos solos testados. Segundo Bedell et al. (2006), a utilidade da germinação e crescimento inicial da planta na avaliação da fitotoxicidade de solos deve-se ao facto destes parâmetros permitirem integrar os efeitos do *stress* ambiental. No entanto, outros autores têm sugerido a avaliação de outros



parâmetros pertencentes a níveis de organização inferiores, os quais poderão ser mais sensíveis ao impacto de tóxicos, permitindo-nos não só detectar os seus efeitos precocemente, como também compreender os seus mecanismos de acção (e.g. MacFarlane, 2002; Fátima e Ahmad, 2005; Côrrea et al., 2006; Monteiro et al., 2009; Sun et al., 2010). Os principais biomarcadores que têm sido avaliados quer em plantas aquáticas, quer em plantas terrestres, têm sido parâmetros relacionados com a actividade fotossintética, com processos enzimáticos de nutrição, com a síntese de metabolitos secundários, *stress* oxidativo e mecanismos de destoxificação (Ferrat et al., 2003). Assim, e com o objectivo de avaliar a possível integração de parâmetros fisiológicos e de *stress* oxidativo em ensaios ecotoxicológicos com plantas, estes parâmetros foram igualmente medidos nas plantas expostas aos diferentes solos da mina de Ervedosa (e.g. conteúdo hídrico, clorofila *a+b*, carotenóides,  $F_v/F_m$ ,  $\Phi PSII$ , permeabilidade da membrana, prolina e conteúdo em Malondialdeído - MDA). Os resultados obtidos demonstraram maior sensibilidade de alguns parâmetros na medida em que foi observado o seu comprometimento em plantas expostas a um maior número de solos mineiros, quando comparadas com as plantas expostas ao solo de Referência (REF). No que refere aos parâmetros de fluorescência (Figura 10), a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II após adaptação ao escuro ( $F_v/F_m$ ), que nos dá uma medida da eficiência máxima do fotossistema II quando todos os seus centros de reacção estão abertos (Maxwell e Johnson, 2000), foi particularmente afectada nos solos C3, D4, E1, E3 e F2, enquanto que o rendimento das plantas, avaliado pela eficiência fotoquímica do fotossistema II ( $\Phi PSII$ ), foi significativamente reduzido nos grupos de plantas expostos aos solos C1, D4 e E3. De acordo com Sgardelis et al. (1994) e Maxwell e Johnson (2000), os parâmetros de fluorescência podem dar-nos indicação sobre a capacidade das plantas de tolerarem o *stress* ambiental, assim como o impacto dos contaminantes no aparelho fotossintético, directamente, ou em processos fisiológicos que afectem a fotossíntese de forma indirecta. Apesar da redução na taxa  $F_v/F_m$  registada em alguns solos, os valores registados estiveram sempre próximos da gama 0,778-0,860, considerada como normal em plantas não sujeitas a *stress* (Björkman e Demmig, 1987 in Sgardelis et al. 1994). Contudo,

este parâmetro tem sido considerado como menos sensível que  $\Phi$ PSII (Martínez-Penalver, 2011).

O parâmetro  $\Phi$ PSII permite-nos idealizar a proporção de luz absorvida pelo fotossistema II que é usada no processo fotoquímico (Maxwell and Jonhson, 2000), ou seja, representa o número de electrões transportados pelo centro de reacção do fotossistema II, por mole de quanta de luz absorvida pelo fotossistema (Monnet et al. 2001). Este parâmetro sofreu igualmente uma redução significativa para as plantas expostas aos solos D4 e E1 (em paralelo com Fv/Fm), o que sugere que, neste caso, os metais presentes nos solos e que, potencialmente, poderão ter sido absorvidos, afectaram, ainda que de forma ligeira, o fotossistema II e a sua actividade fotossintética, possivelmente através da interacção de alguns dos metais com os centros de reacção do fotossistema II ou com o complexo de produção de oxigénio (Cherif et al., 2010; Monnet et al. 2001), reduzindo a sua eficiência. Reduções significativas de  $\Phi$ PSII foram igualmente registadas para as plantas expostas a outros solos (F4 e C1) e para as quais não houve alterações significativas na eficiência fotoquímica máxima.

A composição em pigmentos está também relacionada com a absorção e emissão de energia e tem demonstrado estar relacionada com o estado fisiológico das plantas. As plantas sujeitas a *stress*, de uma forma geral, produzem mais carotenóides do que clorofila, pelo que a taxa de carotenóides/clorofilas tem sido usada como um indicador de *stress* (Martínez-Penalver, 2011). Neste estudo, houve, de facto, um aumento significativo no conteúdo em carotenóides nas plantas expostas aos solos C2, C3, D1, F2, F3 e F4, em comparação com as plantas expostas ao solo de referência. Apesar da alteração no conteúdo em carotenóides, não se observou uma redução significativa do conteúdo em clorofilas, para as plantas expostas aos diferentes solos.

Elevadas quantidades de metais podem provocar *stress* fisiológico, levando à formação de radicais livres (Zengin e Munzuroglu, 2005; Choudary et al., 2007). Este *stress* vai dar origem à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS). O malondialdeído (MDA) é um produto citotóxico resultante da peroxidação lipídica, que indica a produção de radicais livres e consequente dano tecidual (Choudary et al., 2007). A acumulação de MDA nas folhas das plantas parece ser um

indicador adequado de *stress* por metais e indica também dano oxidativo nas membranas (Gallego et al., 1996; Belkhadi et al., 2010). Em circunstâncias normais, devido à actividade de enzimas de protecção, como, por exemplo, a catalase e a superóxido dismutase, a quantidade de ROS permanece baixa (Macfarlane e Burchett, 2001; Choudary et al., 2007). No presente estudo, pode observar-se esta relação entre a exposição a solos ácidos e a sua influência no crescimento e produção de biomassa das plantas. Contudo, apesar da variabilidade, o parâmetro potencialmente indicador da ocorrência de *stress* oxidativo (o conteúdo em MDA) não mostrou diferenças significativas entre solos, o que sugere que, para o tempo de exposição em causa, o sistema antioxidante foi eficiente. Sun et al. (2010) observaram um aumento da actividade das enzimas SOD (superoxide dismutase), CAT (catalase) e POD (peroxidases) em *Raphanus sativus* L., em resposta à exposição a uma concentração de Cu de 100 mg Kg<sup>-1</sup>, o que impediu alterações significativas no conteúdo em MDA. Contudo, este efeito protector das enzimas do sistema antioxidativo demonstrou ser dependente da dose e do tempo de exposição, pois aumentando a dose para 200 mg Kg<sup>-1</sup>, assim como o tempo de exposição, a actividade destas enzimas diminuiu e o conteúdo em MDA aumentou. Os carotenóides podem também actuar como agentes anti-oxidantes (Martínez-Penalver, 2011), pelo que o seu aumento significativo em plantas expostas a alguns solos (C2, C3, D1, F2, F3 e F4) pode ter contribuído para que não se tenha registado um aumento do conteúdo em MDA (Feisthauer et al., 2006; Martí et al., 2007; Pereira et al., 2009).

A exposição a metais tóxicos leva à acumulação de grandes quantidades de prolina nas plantas (Cui e Zhao, 2011). Segundo Choudary et al. (2007), a prolina é bastante acumulada em várias plantas sob *stress*, proporcionando a protecção contra os danos causados por ROS (espécies reactivas de oxigénio). A prolina desempenha um papel importante na osmorregulação, protecção de enzimas, estabilização da maquinaria de síntese proteica, regulação da acidez citosólica e eliminação de radicais livres. Actua também como um eficaz supressor de oxigénio (Choudary et al., 2007). Apesar de não se terem registado diferenças significativas no conteúdo em prolina de plantas expostas aos

diferentes solos, o aumento registado para alguns dos solos (D2, D3, F2 e F4) pode ter estado associado igualmente a uma resposta antioxidante global.

Por último, no que refere ao conteúdo hídrico das folhas, este foi significativamente afectado não só nas plantas expostas ao solo D1, como também aos solos F2 e F3. Tal facto foi igualmente observado por Vernay et al. (2007) em *Lolium perenne* L. exposta a crómio. Estes autores sugeriram a inibição do desenvolvimento da raiz induzido pelos metais, a redução na absorção de água ou um distúrbio no fornecimento de água à parte aérea da planta como uma possível explicação para o reduzido conteúdo em água nas folhas.



## Conclusão

---



## 5. Conclusão

Actualmente, são cada vez mais as perturbações antropogénicas nos ecossistemas que levam à sua degradação. Neste trabalho, destaca-se a exploração mineira que perturba o ambiente devido aos amontoados de escória e desperdícios da exploração, que vão comprometer a sustentabilidade das comunidades terrestres e aquáticas das zonas adjacentes. Deste modo, as minas abandonadas apresentam-se, assim, como uma grande preocupação para as entidades responsáveis pelos processos de recuperação e remediação destes locais, pelo que a ARE é, realmente, uma ferramenta útil e importante para a gestão destes locais contaminados.

Pode referir-se que os solos F1 e D1 da área mineira de Ervedosa poderão ter algumas das suas funções afectadas, pois observaram-se efeitos ao nível da germinação e do crescimento, respectivamente, no ensaio ecotoxicológico com *Zea mays*, podendo estar comprometida a capacidade destes solos para actuarem como substrato para plantas, e efeitos sobre a produção de biomassa vegetal, que poderão estar relacionados com a contaminação do solo. O solo F1 trata-se realmente de um solo bastante tóxico, tendo em conta os resultados observados para *Lemna minor* e *Zea mays*. A capacidade de retenção de alguns solos está também comprometida, na medida em que houve uma forte inibição do crescimento de *L. minor* quando exposta aos seus elutriados. Do ponto de vista da análise de risco ecológico, estes ensaios justificavam que se complementasse a avaliação com ensaios com microrganismos e com invertebrados.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, outros parâmetros bioquímicos e de fluorescência, que nos permitem avaliar o estado fisiológico e a performance de plantas, podiam ser incluídos nos ensaios de toxicidade padronizados com plantas, de forma a aumentar a capacidade de avaliar os efeitos da exposição a solos contaminados e assim reduzir o grau de incerteza na determinação dos riscos associados. Tal facto foi igualmente demonstrado por outros autores, expondo plantas a metais em cultura hidropónica e em condições laboratoriais (Monteiro et al., 2009). Contudo, o presente estudo reforça igualmente esta ideia para ensaios com solos contaminados a realizar no âmbito



de uma análise de risco de uma área contaminada. Contudo, neste caso, seria importante estudar primeiro o efeito de diferentes propriedades do solo, nestes parâmetros fisiológicos, de forma a eliminar factores de confusão na interpretação dos resultados. Todos os parâmetros incluídos neste estudo são de determinação rápida e pouco dispendiosa e fornecem informação complementar que nos permite compreender de forma integrada a resposta das plantas ao *stress*. Alguns parâmetros, como os parâmetros de fluorescência, têm ainda a vantagem de serem determinados de forma não invasiva.

No futuro deverão desenvolver-se ensaios com uma planta dicotiledónea, visto que, segundo o protocolo ISO 11269-2:1995, devem realizar-se ensaios com espécies monocotiledóneas e dicotiledóneas. Possivelmente, poder-se-á utilizar a espécie *Lactuca sativa* L.

Em suma, pode concluir-se que se avaliássemos somente os parâmetros emergência e biomassa, apenas um solo apresentaria diferenças significativas e seria considerado fitotóxico. Por oposição, e numa análise baseada no peso das evidências, juntando a informação para todos os outros parâmetros (Tabela 6), é possível identificar outros solos capazes de induzir efeitos tóxicos e/ ou *stress* nas plantas.

**Tabela 6:** Quadro-resumo das diferenças significativas observadas para cada parâmetro avaliado no ensaio com *Zea mays* entre os solos relativamente ao solo REF.

Parâmetros/Solos	C1	C2	C3	C4	D1	D2	D3	D4	E1	E2	E3	E4	F1	F2	F3	F4
<b>Emergência</b>																
<b>Biomassa</b>					X											
<b>Conteúdo hídrico</b>					X									X	X	
<b>Clorofila a+b</b>		X	X												X	
<b>Carotenóides</b>		X	X		X									X	X	X
<b>Fv/Fm</b>			X					X	X		X			X		
<b>ΦPSII</b>	X							X	X							X
<b>Permeabilidade da membrana</b>																
<b>Conteúdo em Malondialdeído (MDA)</b>																
<b>Prolina</b>																

## **Bibliografia**

---



## 6. Bibliografia

- An, Y., 2004. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. *Environmental Pollution*, 127: 21–26.
- André A., Antunes S.C., Gonçalves F., Pereira R., 2009. Bait-lamina assay as a tool to assess the effects of metal contamination in the feeding activity of soil invertebrates within a uranium mine area. *Environmental Pollution*. 157, 8-9, 2368-2377.
- Antunes, S. C., Castro, B. B., Nunes, B., Pereira, R., Gonçalves, F., 2008a. In situ bioassay with *Eisenia andrei* to assess soil toxicity in an abandoned uranium mine. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 620–631.
- Antunes, S. C., Castro, B., Pereira, R., Gonçalves, F., 2008b. Contribution for Tier I of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal). II. Soil ecotoxicological screening. *Science Total Environment*, 390, 387–395.
- Antunes, S. C., Pereira, R., Gonçalves, F., 2007. Acute and Chronic Toxicity of Effluent Water from an Abandoned Uranium Mine, *Environmental Contamination and Toxicology*, 53, 207–213.
- ASTM, 1997. Standard guide for *Daphnia magna* life-cycle toxicity tests. Report E1193-97. Philadelphia, USA: American Society for Testing and Materials.
- Azevedo, H., Pinto, C., Fernandes, J., Loureiro, S., Santos, C., 2005. Cadmium Effects on Sunflower Growth and Photosynthesis, *Journal of Plant Nutrition*, 28: 12, 2211 - 2220.
- Azur, 1998. AZUR Environmental, Microtox Omni Manual, Carlsbad, CA, USA (1998).
- Bedell, J-P., Briant, A., Delolme, C., Lassabatère, L., Perrodin, Y., 2006. Evaluation of the phytotoxicity of contaminated sediments deposited “on soil”: II. Impact of water draining from deposits on the development and physiological status of neighbouring plants at growth stage. *Chemosphere*, 62 (2006) 1311–1323.
- Belkhadi, A., Hediji, H., Abbes, Z., .Nouairi, I., Barhoumi, Z., Zarrouk, M., Chaïbi, W., Djebali, W., 2010. Effects of exogenous salicylic acid pre-

- treatment on cadmium toxicity and leaf lipid content in *Linum usitatissimum* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73 (2010) 1004–1011.
- Canadian Council of Ministers of the Environment, 1999, updated 2001.
- CARACAS, 1998. Concerted Action on Risk Assessment for Contaminated Sites in the European Union 1996–1998 – Risk Assessment for Contaminated Sites in Europe. Nottingham, UK.
- Carlou, C., 2007. Derivation methods of soil screening values in Europe. a review and evaluation of national procedures towards harmonisation. JRC, Scientific and Technical Reports. EUR 22805, EN 2007.
- Carvalho J., Gavina A., Cruz T., Gonçalves F., Pereira R., Antunes S.C. (2010), Minas da Ervedosa: no passado uma mina, hoje um laboratório natural. CAPTAR – Ciência e ambiente para todos (2, 2, 29-45).
- Causy, D., Gochfeld, M., Gurzau, E., Neagu, C., Ruedel, H., 2003. Lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability, and risk, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 45–51.
- CCME, 2001. Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health. Canadian Environmental Quality Guidelines.
- CEE, 1993. Comunidade Económica Europeia. Directiva 93/67/CEE da Comissão, de 20 de Julho de 1993. Journal Oficial, nº L227. p. 009-0018.
- Chapman, P.M., 1990. The Sediment Quality Triad approach to determining pollution induced degradation. *Science of Total Environment*, 97: 815-825.
- Cherif, J., Derbel, N., Nakkach, M., von Bergmann, H., Jemal, F., Lakhdar, Z. B., 2010. Analysis of in vivo chlorophyll fluorescence spectra to monitor physiological state of tomato plants growing under zinc stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 101 (2010) 332–339.
- Choudary, M., Jetley, U. K., Khan, M. A., Zutshi, S., Fatma, T., 2007. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66 (2007) 204–209.
- Clijsters, H., Van Assche, F., 1985. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynthesis Research*, 7, 31-40.
- Corrêa, A. X. R., Rörig, L. R., Verdinelli, M. A., Cotelle, S., Férard, J.-F., Radetski, C. M., 2006. Cadmium phytotoxicity: Quantitative sensitivity

- relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers. *Science of the Total Environment*, 357 (2006) 120– 127.
- Cui, Y., Zhao, N., 2011. Oxidative stress and change in plant metabolism of maize (*Zea mays* L.) growing in contaminated soil with elemental sulfur and toxic effect of zinc. *Plant Soil and Environment*, 57, 2011 (1): 34–39.
- Dias, M. C., Brüggemann, W., 2010. Limitations of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* under drought stress: gas exchange, chlorophyll fluorescence and Calvin cycle enzymes. *PHOTOSYNTHETICA*, 48 (1): 96-102, 2010.
- Díaz, S., Fargione J., Chapin III, F. S., Tilman, D., 2006. Biodiversity Loss Threatens Human Well-Being. *PLoS Biology*, 4(8): e277. doi: 10.1371/journal.pbio.0040277.
- EEA, 2000. European Environment Agency. Down to earth: Soil degradation and sustainable development in Europe. A challenge for the 21st century. UNEP Regional Office for Europe, Environmental issue series No 16, Copenhagen.
- Elkahoui, E., Hernández, J.A., Abdelly, C., Ghrir, R., Limama, F., 2005. Effects of salt on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharanthus roseus* suspension cells. *Plant Science*, 168, 607–613.
- FAOUN, 1984. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Physical and chemical methods of soil and water analysis. 2<sup>nd</sup> Ed. *Soil Bulletin*, 10: 1-275.
- Fatima, R. A., Ahmad, M., 2005. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Science of the Total Environment* 346 (2005) 256– 273.
- Fayiga, A. O., Ma, L. Q., Cao, X., Rathinasabapath, B., 2004. Effects of heavy metals on growth and arsenic accumulation in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L., *Environmental Pollution*, 132: 289–296.
- Feisthauer, N. C., Stephenson, G. L., Princz, J. I., Scroggins, R. P., 2006. Effects of metal-contaminated forest soils from the Canadian shield to terrestrial organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 25, No. 3, pp. 823–835, 2006.

- Ferrat, L., Pergent-Martini, C., Roméo, M., 2003. Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. *Aquatic Toxicology*, 65 (2003) 187-204.
- Fishwick, S., 2004. Soil screening values for use in UK Ecological Risk Assessment. Environment Agency, Bristol.
- Franco-Hernández, M. O., Vásquez-Murrieta, M. S., Patiño-Siciliano, A., Dendooven, L., 2010. Heavy metals concentration in plants growing on mine tailings in Central Mexico. *Bioresource Technology*, 101; 3864–3869.
- Gallego, S. M., Benavides, M. P., Tomaro, M. L., 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science*, 121 (1996) 151 159.
- Gallego, S. M., Benavides, M. P., Tomaro, M. L., 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science*, 121 (1996) 151 159.
- Gong, P., Wilke, B. M., Strozzi, E., Fleischmann, S., 2001. Evaluation and refinement of a continuous seed germination and early seedling growth test for the use in ecotoxicological assessment of soils. *Chemosphere*, 44: 491-500.
- Gorsuch, J. W., Lower, W. R., Lewis, M. A., Wang, W., 1991. Plants for Toxicity Assessment, Vol. 2, ASTM STP 1115. ASTM, Philadelphia.
- Gupta, A. K., Sinha, S., 2007. Assessment of single extraction methods for the prediction of bioavailability of metals to *Brassica juncea* L. Czern. (var. Vaibhav) grown on tannery waste contaminated soil, *Journal of Hazardous Materials*, 149: 144–150.
- Ha, N. T. H., Sakakibara, M., Sano, S., Nhuan, M. T., 2011. Uptake of metals and metalloids by plants growing in a lead–zinc mine area, Northern Vietnam, *Journal of Hazardous Materials*, 186: 1384–1391.
- Horvat, T., Vidaković-Cifrek, Ž., Oreščanin, V., Tkalec, M., Pevalek-Kozlina, B., 2007. Toxicity assessment of heavy metal mixtures by *Lemna minor* L. *Science of the Total Environment*, 384 (2007) 229–238.
- Houba, V. J. G., Temminghoff, E. J. M, Gaikhorst, G. A., van Vark, W., 2000. Soil Analysis Procedures Using 0.01 M Calcium Chloride as Extraction Reagent. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 31(910), 1299-1396.

- ISO, 1995. Soil quality—Determination of the effects of pollutants on soil flora—  
Part 2: Effects of chemicals on the emergence of higher plants. ISO—The  
International Organization for Standardization, Geneva. ISO 11269-2: 7.
- ISO, 1996a. Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) -  
Part 2: Determination of effects on reproduction. ISO - The International  
Organization for Standardization, ISO 11268-2.2.
- ISO, 1996b. Water quality: determination of the inhibition of the mobility of  
*Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — acute toxicity test. ISO—  
The International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. ISO  
6341.
- ISO, 1997. Soil quality -- Determination of soil microbial biomass - Part 1:  
Substrate-induced respiration method. ISO - The International Organization  
for Standardization, ISO 14240-1:1997.
- ISO, 1999. Soil quality - Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia  
candida*) by soil pollutants. ISO—The International Organization for  
Standardization, ISO 11267.
- ISO, 2000. Water quality: determination of long term toxicity of substances to  
*Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). ISO—The International  
Organization for Standardization, Geneva. ISO 10706.
- ISO, 2002. Soil quality – Laboratory methods for determination of microbial soil  
respiration. ISO—The International Organization for Standardization, ISO  
16072: 2002.
- ISO, 2004a. – Soil quality - Effects of Pollutants on Enchytraidae (*Enchytraeus  
sp.*) - Determinations of effects on Reproduction and Survival. ISO—The  
International Organization for Standardization, ISO 16387.
- ISO, 2007. Soil quality -- Avoidance test for determining the quality of soils and  
effects of chemicals on behaviour -- Part 1: Test with earthworms (*Eisenia  
fetida* and *Eisenia andrei*). ISO—The International Organization for  
Standardization, ISO 17512-1.
- ISO, 2008. Soil quality -- Avoidance test for determining the quality of soils and  
effects of chemicals on behaviour -- Part 2: Test with collembola (*Folsomia  
candida*). ISO—The International Organization for Standardization, ISO  
17512-2.



- ISO. 2005. Soil quality: avoidance test for testing the quality of soils and the toxicity of chemicals - test with earthworms (*Eisenia fetida*). ISO—The International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Jensen, J., Mesman, M., 2006. Ecological Risk Assessment of Contaminated Land. Decision Support for site specific investigations. RIVM report number 711701047. National Institute for Public Health and the Environment, The Netherlands, 136 pp.
- Khedr, A. H. A., Abbas, M. A., Wahid, A. A. A., Quick, W. P., Abogadallah, G. B., 2003. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancratium maritimum* L. to salt-stress. Journal of Experimental Botany, 54(392), 2553-2562.
- Kim, J. Y., Kim, K. W., Ahn, J., Ko, I., Lee, C. H., 2005. Investigation and risk assessment modeling of As and other heavy metals contamination around five abandoned metal mines in Korea. Environmental Geochemistry and Health, 27:193–203.
- Kiss, I., Kováts, N., Szalay, T., 2003. Evaluation of some alternative guidelines for risk assessment of various habitats. Toxicology Letters 140-141 (2003) 411-417.
- Kranner, I., Colville, L., 2011. Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. Environmental and Experimental Botany, 72 (2011) 93–105.
- Krause, G. H., Weis, E., 1991. CHLOROPHYLL FLUORESCENCE AND PHOTOSYNTHESIS: The Basics. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1991.42:313-49.
- Krugh, B. W., Miles, D., 1996. Monitoring the effects of five “Nonherbicidal” pesticide chemicals on terrestrial plants using chlorophyll fluorescence. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 15, No. 4, pp. 495–500.
- Lee, S. W., Lee, B. T., Kim, J. Y., Kim, K. W., Lee, J. S., 2006. Human risk assessment for heavy metals and as contamination in the abandoned metal mine areas, Korea, Environmental Monitoring Assessment, 119:233–44.
- Lee, S., Park, H., Koo, N., Hyun, S., Hwang, A., 2011. Evaluation of the effectiveness of various amendments on trace metals stabilization by chemical and biological methods, Journal of Hazardous Materials, 188: 44–51.

- Lima, M. P. R., Soares, A. M. V. M., Loureiro, S., 2011. Combined effects of soil moisture and carbaryl to earthworms and plants: Simulation of flood and drought scenarios, *Environmental Pollution*, 159: 1844-1851.
- Lopes, I., Gonçalves, F., Soares, A. M. V. M., Ribeiro, R., 1999. Discriminating the Ecotoxicity Due to Metals and to Low pH in Acid Mine Drainage. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44: 207-214.
- Loureiro, S., Santos, C., Pinto, G., Costa, A., Monteiro, M., Nogueira, A. J. A., Soares, A. M. V. M., 2006. Toxicity Assessment of Two Soils from Jales Mine (Portugal) Using Plants: Growth and Biochemical Parameters *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50, 182–190.
- Lourenço, J. I., Pereira, R. O., Silva, A. C., Morgado, J. M., Carvalho, F. P., Oliveira, J. M., Malta, M. P., Paiva, A. A., Mendo, S. A., Gonçalves, F. J., 2011. Genotoxic endpoints in the earthworms sub-lethal assay to evaluate natural soils contaminated by metals and radionuclides. *Journal of Hazardous Materials*, 15;186(1):788-95.
- Lutts, S., Kinet, J. M., Bouharmont, J., 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. – *Annals of Botany*, 78: 389-398.
- Macfarlane, G. R., Burchett, M. D., 2001. Photosynthetic Pigments and Peroxidase Activity as Indicators of Heavy Metal Stress in the Grey Mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 42, No. 3, pp. 233-240, 2001.
- Maksymiec, W., 2007. Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, (2007) 29:177–187.
- Martí, E., Sierra, J., Sánchez, M., Cruañas, R., Garau, M. A., 2007. Ecotoxicological tests assessment of soils polluted by chromium (VI) or pentachlorophenol. *Science of the Total Environment*, 378 (2007) 53–57.
- Martínez-Peñalver, A., Reigosa, M. J., Sánchez-Moreiras, A. M., 2011 (in press). Imaging chlorophyll a fluorescence reveals specific spatial distributions under different stress conditions. *Flora*.
- Maxwell, K., Johnson, G. N., 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 51, No. 345, pp. 659-668, April 2000.
- Monnet, F., Vaillant, N., Vernay, P., Coudret, A., Sallanon, H., Hitmi, A., 2001. Relationship between PSII activity, CO<sub>2</sub> fixation, and Zn, Mn and Mg contents

- of *Lolium perenne* under zinc stress. *Journal of Plant Physiology*, 158. 1137–1144 (2001).
- Monni, S., Uhlig, C., Hansen, E., Magel, E., 2001. Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution. *Environmental Pollution*, 112: 121-129.
- Monteiro, M. S., Santos, C., Soares, A. M. V. M., Mann, R. M., 2009. Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (2009) 811–818.
- Moreira-Santos, M., Antunes, S. C., Gonçalves, F., Soares, A. M. V. M., Ribeiro, R., 2011. An in situ toxicity assay with the local phytoplankton community. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 30, No. 1, pp. 196–205.
- Moreno-Jiménez, E., García-Gómez, C., Oropesa, A. L., Esteban, E., Haro, A., Carpena-Ruiz, R., Tarazona, J. V., Peñalosa, J. M., Fernández, M. D., 2011. Screening risk assessment tools for assessing the environmental impact in an abandoned pyritic mine in Spain. *Science of the Total Environment*, 409: 692–703.
- Munzuroglu, O., Geckil, H., 2002. Effects of Metals on Seed Germination, Root Elongation, and Coleoptile and Hypocotyl Growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43, 203–213.
- Naidu, R., Bolan, N., Megharaj, M., Juhasz, A., Lombi, E., Smith, E., 2010. Human and ecological risk assessment of contaminated sites – Key knowledge gaps. *World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World 1 – 6 August 2010, Brisbane, Australia*.
- Novais, H. J. G. S. Q., 2006. Avaliação da qualidade dos solos e da água subterrânea na envolvente das Minas de Ervedosa (NE de Portugal). Produção de recursos didácticos. Tese de Mestrado. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- OCDE, 2006. *Lemna* sp. Growth Inhibition Test. OECD Guideline for Testing of Chemicals, Paris, France.
- OCDE, 2008. Predatory mite reproduction test in soil (*Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*). OECD—Organization for Economic Cooperation and Development.

- OECD, 1984. Algal growth inhibition test. OECD Guideline for Testing of Chemicals 201. Paris, France.
- OECD, 2000. *Daphnia* sp., acute immobilization test. Revised Proposal for Updating Guideline, vol. 202. Paris, France: Organization for the Economic Cooperation and Development.
- OECD, 2003. Terrestrial plant test: Seedling emergence and seedling growth test. OECD—Organization for Economic Cooperation and Development, Paris. 208: 6.
- O'Halloran, K., 2006. Toxicological Considerations of Contaminants in the Terrestrial Environment for Ecological Risk Assessment. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 12: 1, 74 – 83.
- Peijnenburg, W. J. G. M., Jager, T., 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. Ecotoxicology and Environmental Safety, 56: 63–77.
- Peijnenburg, W. J. G. M., Zablotskaja, M., Vijver, M. G., 2007. Monitoring metals in terrestrial environments within a bioavailability framework and a focus on soil extraction, Ecotoxicology and Environmental Safety, 67 (2007) 163–179.
- Pereira, R., Marques, C. R., Silva Ferreira, M. J., Neves, M. F. J. V., Caetano, A. L., Antunes, S. C., Mendo, S., Gonçalves, F., 2009. Phytotoxicity and genotoxicity of soils from an abandoned uranium mine area. Applied Soil Ecology, 42: 209–220.
- Pereira, R., Ribeiro, R., Gonçalves, F., 2004. Plan For An Integrated Human And Environmental Risk Assessment In S. Domingos Mine Area (Portugal). Human and Ecological Risk Assessment, 10(3): 543-578.
- Pfleeger, T. G., Ratsch, H. C., Shimabuku, R. A., 1993. A review of terrestrial plants as biomonitors. Environmental Toxicology and Risk Assessment: 2<sup>nd</sup> Volume. ASTM STP 1216.
- Provoost, J., Reijnders, L., Swartjes, F., Bronders, J., Carlon, C., D'Alessandro, M., Cornelis, C., 2008. Parameters causing variation between soil screening values and the effect of harmonization. Journal of Soils and Sediments, 8: 298-311.
- Rainbow, P. S., Kriefman, S., Smith, B. D., Luoma, S. N., 2011, Have the bioavailabilities of trace metals to a suite of biomonitors changed over three

- decades in SW England estuaries historically affected by mining?. *Science of the Total Environment*, 409: 1589–1602.
- Razo, I., Carrizales, L., Castro, J., Díaz-Barriga, F., Monroy, M., 2004. Arsenic And Heavymetal Pollution Of Soil,Water And Sediments In A Semi-Arid Climate Mining Area In Mexico. *Water, Air, And Soil Pollution*, 152: 129–152.
- Ribeiro, R., Lopes, I., Pereira, A. M. M., Gonçalves, F., Soares, A. M. V. M., 2000. Survival Time of *Ceriodaphnia dubia* in Acid Waters with Metal Contamination. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, 64:130-136.
- Rutgers, M., Faber, J. H., Postma, J. F., Eijsackers, H., 2000. Site-specific ecological risks: A basic approach to the function-specific assessment of soil pollution. Report 28. The Netherlands, Integrated Research Programme.
- Sauvé, S., Norvell, W., McBride, M., Hendershot, W., 2000. Speciation and Complexation of Cadmium in Extracted Soil Solutions, *Environmental Science & Technology*, 34, 291-296.
- Semenzin, E., Critto, A., Carlon, C., Rutgers, M., Marcomini, A., 2007. Development of a site-specific Ecological Risk Assessment for contaminated sites: Part II. A multi-criteria based system for the selection of bioavailability assessment tools, *Science of the Total Environment*, 379: 34–45.
- Semenzin, E., Crittoa, A., Rutgersc, M., Marcominia, A., 2008. Integration of bioavailability, ecology and ecotoxicology by three lines of evidence into ecological risk indexes for contaminated soil assessment. *Science of the total Environment*, 389:71-86.
- Sgardelis, S., Cook, C. M., Pantis, J. D., Lanaras, T., 1994. Comparison of chlorophyll fluorescence and some heavy metal concentrations in *Sonchus* spp. and *Taraxacum* spp. along an urban pollution gradient. *The Science of the Total Environment*, 158 (1994) 157-164.
- Sims, D. A., Gamon, J. A., 2002. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment*, 81 (2002) 337– 354.
- Sousa, A., Pereira, R., Antunes, S.C., Cachada, A., Pereira, E., Duarte, A.C., Gonçalves, F., 2008. Validation of avoidance assays for the screening assessment of soils under different anthropogenic disturbances. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71: 661–670.

- SPAC, 2000. Soil and Plant Analysis Council – Handbook of Reference Methods. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Sun, B.-Y., Kan, S.-H., Zhang, Y.-Z., Deng, S.-H., Wu, J., Yuan, H., Qi, H., Yang, G., Li, L., Zhang, X.-H., Xiao, H., Wang, Y.-J., Peng, H., Li, Y.-W., 2010. Certain antioxidant enzymes and lipid peroxidation of radish (*Raphanus sativus* L.) as early warning biomarkers of soil copper exposure. *Journal of Hazardous Materials*, 183 (2010) 833–838.
- Suter II, G. W., Barnthouse, L. W., Bartell, S. M., Mill, T., Mackay, D., Paterson, S.; 1993; *Ecological Risk Assessment*, USA, Lewis Publishers.
- Suter, G. W., Efroymson, R. A., Sample, B. E., Jones, D. S., 2000. *Ecological risk assessment for contaminated sites*. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers.
- Swartjes, F. A., Carlon, C., Wit, N. H. S. M., 2008. The possibilities for the EU-wide use of similar ecological risk-based soil contamination assessment tools. *Science of the Total Environment*, 406: 523–529.
- Teisseire, H., Couderchet, M., Vernet, G., 1998. Toxic Responses and Catalase Activity of *Lemna minor* L. Exposed to Folpet, Copper, and Their Combination. *ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY*, 40, 194-200 (1998).
- USEPA, 1998. United States Environmental Protection Agency. Guidelines for ecological risk assessment. EPA/630/R-95/002F. Risk assessment forum, Washington, DC.
- Van Assche, F., Alonso, J.L., Kapustka, L.A., Petrie, R., Stephenson, G. L., Tossell, R., 2002. *Terrestrial Plant Toxicity Tests. Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soil*. SETAC Press. pp.59-77(128).
- Vásquez-Murrieta, M. S., Migueles-Garduño, I., Franco-Hernández, O., Govaerts, B., Dendooven, L., 2006. C and N mineralization and microbial biomass in heavy-metal contaminated soil. *European Journal of Soil Biology*, 42 (2006) 89–98.
- Verkleij, J. A. C., 1994. *Effects of Heavy Metals, Organic Substances, and Pesticides on Higher Plants. Ecotoxicology of soil organisms*. SETAC Press. pp. 139-161.

- Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Hitmi, A., 2007. Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. *Chemosphere*, 68 (2007) 1563–1575.
- Wang, W., 1986. Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, Volume 11, Issue 1, 1986, Pages 1-14.
- Weeks, J.M., Comber, S. D. W., 2005. Ecological risk assessment of contaminated soil. *Mineralogical Magazine*, 69(5): 601-613.
- Weeks, J.M., Sorokin, N., Johnson, I.J, Whitehouse, P., Ashton, D., Spurgeon, D., Hankard P., Svendsen, C., Hart, A., 2004. Biological Test Methods for Assessing Contaminated Land. Stage 2 - A demonstration of the use of a framework for the ecological risk assessment of land contamination. Environment Agency. ISBN : 1844322963.
- Wienhold, B. J., Varvel, G. E. e Doran, J. W., 2004. QUALITY OF SOIL - *Encyclopedia of Soils in the Environment*, Academic Press. Vol.4, Pages 349-353.
- Wild, A., 1993. *Soils and the Environment: An Introduction*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Zar JH. *Biostatistical analysis*. 3rd Edition. New Jersey: Prentice-Hall International Inc; 1996.
- Zengin, F. K., Munzuroglu, O., 2005. Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47/2: 157–164, 2005.